

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.14.007

隐丹参酮通过调节 SDF-1/CXCR4 信号通路保护人骨髓间充质干细胞 免受过氧化氢诱导的细胞凋亡*

李 华¹ 侯春霞¹ 王俊芝¹ 刘玉强¹ 肖克源^{2Δ}

(1 长治医学院附属医院 / 长治市人民医院药剂科 山西 长治 046000;

2 长治医学院附属医院 / 长治市人民医院中心实验室 山西 长治 046000)

摘要 目的:探讨隐丹参酮调节基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/C-X-C 型趋化因子受体 4(CXCR4)信号通路抑制过氧化氢诱导的人骨髓间充质干细胞(BMSC)凋亡的作用机制。**方法:**体外培养人骨髓间充质干细胞(HBMSC),利用 H₂O₂ 建立氧化应激模型。将 HBMSC 细胞分为对照组(不进行氧化应激诱导)、模型组(500 μmol/L H₂O₂ 诱导 24 h)、隐丹参酮低剂量组(10 μmol/L)、隐丹参酮中剂量组(20 μmol/L)、隐丹参酮高剂量组(40 μmol/L)。细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞活性;流式细胞术检测细胞凋亡;酶联免疫吸附法(Elisa)检测细胞葡萄糖摄取量和乳酸水平;微量法检测细胞中谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量;蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、SDF-1、CXCR4 蛋白表达情况。**结果:**与对照组比较,模型组 HBMSC 细胞葡萄糖摄取量和乳酸水平、GSH、SOD 活性、Bcl-2 蛋白表达、SDF-1/CXCR4 信号通路蛋白表达下降,细胞凋亡率、凋亡蛋白 caspase-3、Bax 表达、MDA 含量上升($P<0.05$);与模型组比较,隐丹参酮低、中、高剂量组 HBMSC 细胞葡萄糖摄取量和乳酸水平、GSH、SOD 活性、Bcl-2 蛋白表达、SDF-1/CXCR4 信号通路蛋白表达上升,细胞凋亡率、凋亡蛋白 caspase-3、Bax 表达、MDA 含量下降($P<0.05$),且隐丹参酮低、中、高剂量组各指标差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**隐丹参酮可能通过促进 SDF-1/CXCR4 信号通路转导,抑制过氧化氢诱导的 BMSC 氧化应激损伤,抑制其凋亡,其中高剂量隐丹参酮的效果最好。

关键词:隐丹参酮;人骨髓间充质干细胞;SDF-1/CXCR4 信号通路;氧化应激;细胞凋亡

中图分类号:R-33;R331.2;R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)14-2639-06

Cryptotanshinone Protects Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Hydrogen Peroxide Induced Cell Apoptosis by Regulating the SDF-1/CXCR4 Signaling Pathway*

LI Hua¹, HOU Chun-xia¹, WANG Jun-zhi¹, LIU Yu-qiang¹, XIAO Ke-yuan^{2Δ}

(1 Department of Pharmacy, Changzhi Medical College Affiliated Hospital/Changzhi People's Hospital, Changzhi, Shanxi, 046000, China;

2 Department of Central Laboratory, Changzhi Medical College Affiliated Hospital/Changzhi People's Hospital,
Changzhi, Shanxi, 046000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism by cryptotanshinone regulates the signaling pathway of stromal cell derived factor 1 (SDF-1)/C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) and inhibits hydrogen peroxide induced cell apoptosis of human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods:** Cultivated human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSCs) in vitro and established an oxidative stress model by H₂O₂. Divided HBMSC cells into control group (without oxidative stress induction) and model group (500 μmol/L H₂O₂ induction for 24 hours), low-dose group of cryptotanshinone (10 μmol/L), medium dose group of cryptotanshinone (20 μmol/L), high-dose group of cryptotanshinone(40 μmol/L). Cell activity was detected by Cell Count Kit (CCK-8). Cell apoptosis was detected by flow cytometry detection. Cellular glucose uptake and lactate levels was detected by enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) testing. The content of glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in cells were detected by micro method. Cysteine aspartate protease 3(caspase-3), B-lymphoblastoma-2 associated X protein (Bax), B-lymphoblastoma-2 (Bcl-2), expression of SDF-1 and CXCR4 proteins was detected by western blot detection (Western blot). **Results:** Compared with the control group, the glucose uptake and lactate levels, GSH, SOD activity, Bcl-2 protein expression, and SDF-1/CXCR4 signaling pathway protein expression of HBMSC cells in the model group decreased, while the cell apoptosis rate, expression of apoptotic protein caspase-3, Bax, and MDA content increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the low, medium, and high dose groups of cryptotanshinone

* 基金项目:山西省卫生健康委科研项目(2023141)

作者简介:李华(1977-),女,本科,主管药师,研究方向:临床及基础药学,E-mail:lh15534563455@163.com

Δ 通讯作者:肖克源(1988-),男,硕士,主管技师,研究方向:生化免疫检验,E-mail:xky1551395@163.com

(收稿日期:2023-12-27 接受日期:2024-01-23)

showed an increase in glucose uptake and lactate levels, GSH, SOD activity, Bcl-2 protein expression, and SDF-1/CXCR4 signaling pathway protein expression in HBMSC cells, while the cell apoptosis rate, expression of apoptotic proteins caspase-3, Bax, and MDA content decreased ($P < 0.05$). The differences in various indicators among the low, medium, and high dose groups of cryptotanshinone were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cryptotanshinone may inhibit oxidative stress damage and apoptosis of BMSC induced by hydrogen peroxide by promoting SDF-1/CXCR4 signaling pathway transduction, with high-dose cryptotanshinone having the best effect.

Key words: Cryptotanshinone; Human bone marrow mesenchymal stem cells; SDF-1/CXCR4 signaling pathway; Oxidative stress; Cell apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R284 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)14-2639-06

前言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 是骨髓中的非造血干细胞, 具有自我更新、显著增殖和分化为各种类型的细胞的能力^[1]。BMSC 可以分化为成骨细胞, 在骨稳态中起着关键作用, 可以用于软骨损伤的修复与肌腱软骨再生等^[2,3]。病变组织中由于活性氧大量产生, 抗氧化系统失衡会引起氧化应激, 而氧化应激则会导致血管损伤和细胞死亡, 影响疾病的治疗^[4]。抑制 BMSC 氧化损伤和凋亡, 是 BMSC 移植促进骨关节炎治疗的关键^[5]。隐丹参酮是从传统中草药丹参的干根和根茎中分离出的天然醌二萜, 具有抗癌、抗炎、抗菌、抗氧化和神经保护作用^[6]。研究发现, 隐丹参酮在诱导人胎盘来源的间充质干细胞分化为心肌细胞过程中发挥重要作用^[7], 并且隐丹参酮通过抑制破骨细胞生成对骨质疏松疾病具有积极的治疗作用^[8], BMSC 的分化不平衡是造成骨质疏松的原因, 而 BMSC 的外泌体具有促进成骨细胞活性的作用^[9]。隐丹参酮可促进 BMSCs 向神经系细胞的发育^[10]。基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1)/C-X-C 型趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 信号通路对胚胎发生、伤口愈合、血管生成、肿瘤生长和增殖起着重要作用, 且该通路可通过改善氧化应激反应, 促进 BMSC 细胞增殖和存活, 在维持骨髓干细胞群的增殖和存活方面起着关键作用^[11]。丹参酮 IIA 和隐丹参酮同属于从丹参中提取的天然活性物质, 丹参酮 IIA 可调控 SDF-1/CXCR4 信号通路, 促进 BMSC 在体内向缺血区域的迁移, 从而对心肌梗死起到治疗效果^[12]。本研究采用 H₂O₂ 诱导人骨髓间充质干细胞 (human bone marrow mesenchymal stem cells, HBMSC) 建立氧化应激模型, 探讨隐丹参酮调节 SDF-1/CXCR4 信号通路抑制过氧化氢诱导的 HBMSC 凋亡的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

隐丹参酮购自上海麦克林生化科技股份有限公司; HBMSC 购自中科院上海细胞研究所; 胎牛血清、DMEM 培养基均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒、胞计数试剂盒 (cell counting Kit, CCK-8) 试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Cysteine aspartic protease 3, cas-

pase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B lymphoblastoma-2-associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (B lymphoblastoma-2, Bcl-2)、SDF-1/CXCR4、磷酸甘油醛脱氢酶 (phosphoglyceraldehyde dehydrogenase, GAPDH) 抗体均购自 Abcam 公司。恒温培养箱、酶标仪、流式细胞仪均购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与氧化应激模型建立 HBMSC 使用 DMEM 完全培养基 (含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素), 在 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。HBMSC 消化后, 选择状态良好的细胞进行传代, 并将其培养至对数期, 用于后续实验。取对数期 HBMSC 细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 mL, 取 200 μ L 接于 96 孔板, 使用 500 μ mol/L H₂O₂ 诱导 24 h, 建立 H₂O₂ 诱导氧化应激模型^[13]。

1.2.2 细胞活性检测 取对数期 HBMSC 细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 mL, 取 100 μ L 接于 96 孔板, 设置隐丹参酮浓度为 2.5、5、10、20、40、80 μ mol/L (溶剂为二甲亚砜), 不同浓度隐丹参酮预处理细胞 2 h 后, 用 500 μ mol/L H₂O₂ 诱导 24 h, 使用 CCK-8 试剂盒检测 HBMSC 细胞活性, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行。使用酶标仪检测各孔光密度 (OD) 值, 并根据各孔 OD 值计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = OD 实验组 / OD 对照组 \times 100%。

1.2.3 细胞分组 将 HBMSC 细胞分为对照组 (不进行氧化应激诱导)、模型组 (500 μ mol/L H₂O₂ 诱导 24 h)、隐丹参酮低剂量组 (10 μ mol/L)、隐丹参酮中剂量组 (20 μ mol/L)、隐丹参酮高剂量组 (40 μ mol/L), 隐丹参酮各组根据 1.2.2 的结果分别加入对应剂量的隐丹参酮预处理 2 h 后, 进行氧化应激诱导。

1.2.4 细胞葡萄糖摄取量和乳酸水平检测 取 1.2.3 培养的细胞, 根据酶联免疫吸附法 (Elisa) 试剂盒说明书进行检测葡萄糖含量和乳酸的水平, 计算细胞上清中及完全培养基中的葡萄糖含量及乳酸含量, 细胞葡萄糖摄取量为完全培养基中的葡萄糖含量与细胞上清葡萄糖含量的差值。

1.2.5 细胞 GSH、SOD、MDA 含量检测 取 1.2.3 培养的细胞, 根据微量法试剂盒检测细胞中 GSH、SOD、MDA 含量, 具体操作根据试剂盒说明书进行。

1.2.6 细胞凋亡情况检测 取 1.2.3 培养的细胞, 胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, 使用 PBS 重悬细胞。先后分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 染液, 混匀, 室温避光孵育 15 min, 待流式细胞仪检测。

1.2.7 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达 取 1.2.3 培养的细胞, PBS 洗涤后, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法

测定蛋白浓度。加入适量蛋白预变性后,进行电泳,然后转膜、使用脱脂牛奶封闭 2 h 后,洗膜,加入一抗 caspase-3(1:1000)、Bax (1:1000)、Bcl-2 (1:1000)、SDF-1 (1:1000)、CXCR4(1:1000)、GAPDH((1:1000)),4℃过夜,加入二抗,ECL 显色,计算各目的蛋白条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 进行数据分析, 计量资料用平均值± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两间比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度隐丹参酮对 HBMSC 细胞活性的影响

与对照组比较, 模型组 HBMSC 细胞存活率明显下降 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 隐丹参酮组 HBMSC (10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)细胞存活率明显增强,并且随着药物浓度增加而逐渐增强 ($P < 0.05$)。在隐丹参酮浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,HBMSC 细胞存活率开始显著增强,选择 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验浓度。如表 1 所示。

表 1 HBMSC 细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 HBMSC cell survival rate ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Concentration of cryptotanshinone ($\mu\text{mol/L}$)	Cell survival rate(%)
Control group	0	100.00± 0.00
Model group	0	52.21± 4.68 [#]
	2.5	53.42± 3.75
	5	55.32± 4.01
	10	62.01± 4.25*
	20	75.31± 5.06*
Cryptotanshinone group	40	91.31± 4.78*
	80	95.20± 5.71*
	F	127.528
	P	0.000

Note: Compare with the control group, [#] $P < 0.05$; Compare with the model group, * $P < 0.05$.

2.2 隐丹参酮对于 HBMSC 细胞葡萄糖摄取量和乳酸水平的影响

与对照组比较,模型组 HBMSC 细胞葡萄糖摄取量和乳酸

水平明显下降 ($P < 0.05$);与模型组比较,隐丹参酮 -L 组、隐丹参酮 -M 组、隐丹参酮 -H 组 HBMSC 细胞葡萄糖摄取量和乳酸水平明显依次上升 ($P < 0.05$),呈剂量依赖性。如表 2 所示。

表 2 HBMSC 细胞葡萄糖摄取量和乳酸水平($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Glucose uptake and lactate levels in HBMSC cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Glucose uptake(mmol/L)	Lactate levels(mmol/L)
Control group	1.94± 0.25	2.36± 0.12
Model group	0.85± 0.12 [#]	1.12± 0.08 [#]
Low dose group of cryptotanshinone	1.24± 0.12*	1.89± 0.15*
Medium dose group of cryptotanshinone	1.56± 0.08* ^{&}	2.35± 0.18* ^{&}
High dose group of cryptotanshinone	1.89± 0.10* ^{&}	3.94± 0.16* ^{&}
F	58.448	314.739
P	0.000	0.000

Note: Compare with the control group, [#] $P < 0.05$; Compare with the model group, * $P < 0.05$; Compare with the low dose group of cryptotanshinone, [&] $P < 0.05$; Compare with the mediumdose group of cryptotanshinone, $P < 0.05$.

2.3 隐丹参酮对于 HBMSC 细胞氧化应激的影响

与对照组比较,模型组 HBMSC 细胞中 GSH、SOD 活性明显下降,MDA 含量明显上升 ($P < 0.05$);与模型组比较,隐丹参酮 -L 组、隐丹参酮 -M 组、隐丹参酮 -H 组 HBMSC 细胞中 GSH、SOD 活性明显依次上升,MDA 含量明显依次下降 ($P < 0.05$),呈剂量依赖性。如表 3 所示。

2.4 隐丹参酮对于 HBMSC 细胞凋亡的影响

与对照组比较, 模型组 HBMSC 细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.05$);与模型组比较,隐丹参酮 -L 组、隐丹参酮 -M 组、隐丹参酮 -H 组 HBMSC 细胞凋亡率明显依次下降 ($P < 0.05$),呈剂量依赖性。如图 1、表 4 所示。

表 3 HBMSC 细胞氧化应激水平($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Oxidative stress levels in HBMSC cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	GSH($\mu\text{g/mL}$)	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mL)
Control group	85.40 \pm 1.72	14.25 \pm 1.78	0.79 \pm 0.05
Model group	65.01 \pm 3.04 [#]	4.03 \pm 0.75 [#]	1.34 \pm 0.08 [#]
Low dose group of cryptotanshinone	71.05 \pm 2.03 [*]	6.20 \pm 0.87 [*]	1.12 \pm 0.08 [*]
Medium dose group of cryptotanshinone	76.44 \pm 4.89 ^{*&}	8.36 \pm 1.03 ^{*&}	0.95 \pm 0.09 ^{*&}
High dose group of cryptotanshinone	86.41 \pm 3.75 ^{*&}	11.47 \pm 1.27 ^{*&}	0.82 \pm 0.07 ^{*&}
F	46.757	69.662	55.367
P	0.000	0.000	0.000

Note: The same as Table 2.

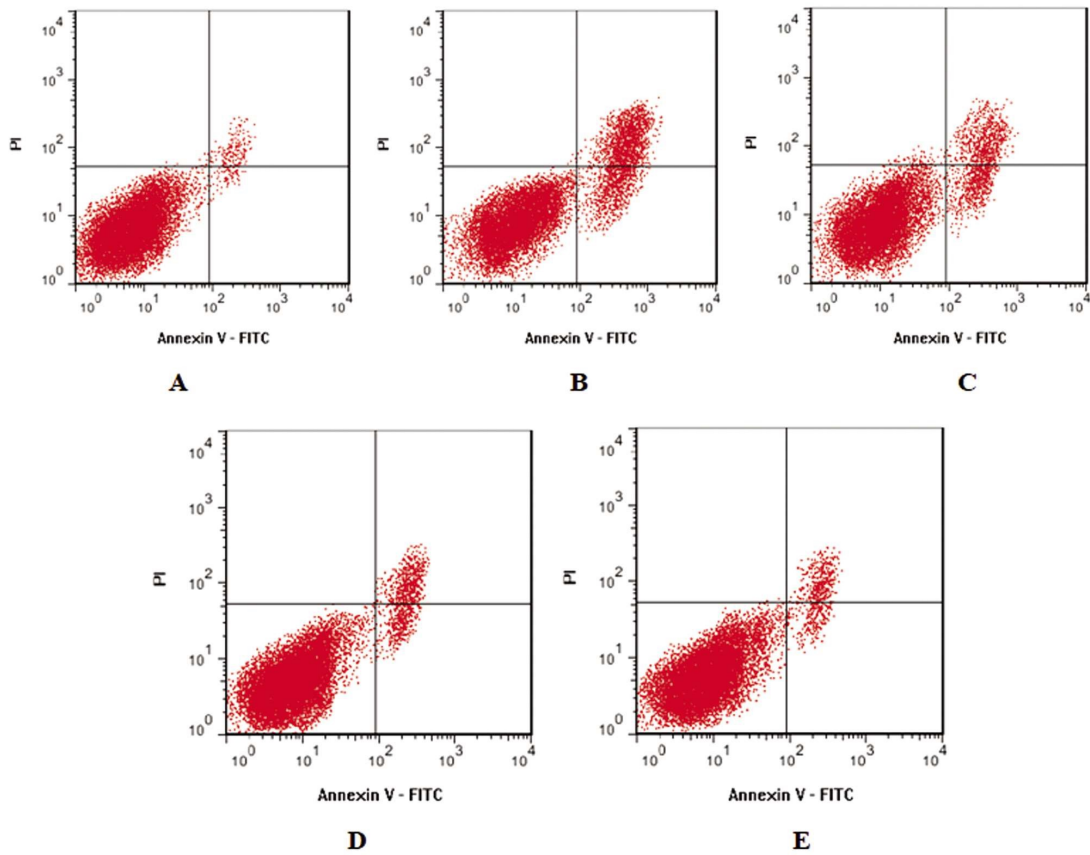


图 1 流式细胞术检测 HBMSC 细胞凋亡

Fig.1 Flow cytometry detection of HBMSC cell apoptosis

Note: A: Control group; B: Model group; C: Low dose group of cryptotanshinone; D: Mediumdose group of cryptotanshinone; E: High dose group of cryptotanshinone.

2.5 隐丹参酮对于 HBMSC 细胞凋亡蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组 HBMSC 细胞促凋亡蛋白 caspase-3、Bax 表达明显上升,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显下降($P<0.05$);与模型组比较,隐丹参酮 -L 组、隐丹参酮 -M 组、隐丹参酮 -H 组 HBMSC 细胞促凋亡蛋白 caspase-3、Bax 表达明显依次下降,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显依次上升($P<0.05$),呈剂量依赖性。如图 2、表 5 所示。

2.6 隐丹参酮对于 HBMSC 细胞 SDF-1/CXCR4 信号通路蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组 HBMSC 细胞 SDF-1、CXCR4 蛋白表达明显下降($P<0.05$);与模型组比较,隐丹参酮 -L 组、隐丹

参酮 -M 组、隐丹参酮 -H 组 HBMSC 细胞 SDF-1、CXCR4 蛋白表达明显依次上升($P<0.05$),呈剂量依赖性。如图 3、表 6 所示。

3 讨论

BMSC 被证明可分化生成骨细胞,对于组织修复和再生具有重要作用^[14]。BMSC 移植后的氧化应激微环境限制了 BMSC 对于组织修复的治疗效果,在病理生理机制中,氧化应激会导致细胞凋亡,对于组织修复具有不利影响^[15]。抑制氧化应激,保护 BMSC 免受氧化应激带来的损伤对于组织修复和再生意义重大。研究发现益母草碱通过 PI3K/Akt/mTOR 途径激活线粒体自噬,保护 BMSC 受氧化应激带来的损伤^[16],寻找

表 4 HBMSC 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of apoptosis rates in HBMSC cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Cell apoptosis rate(%)
Control group	3.94± 0.25
Model group	32.05± 1.12 [#]
Low dose group of cryptotanshinone	21.25± 1.24*
Medium dose group of cryptotanshinone	13.44± 1.25**
High dose group of cryptotanshinone	10.14± 1.12**
F	623.348
P	0.000

Note: The same as Table 2.

表 5 HBMSC 细胞凋亡蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Comparison of apoptosis protein expression in HBMSC cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	caspase-3/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
Control group	0.32± 0.05	0.40± 0.05	1.24± 0.08
Model group	0.85± 0.08 [#]	0.75± 0.06 [#]	0.32± 0.06 [#]
Low dose group of cryptotanshinone	0.74± 0.06*	0.63± 0.06*	0.57± 0.05*
Medium dose group of cryptotanshinone	0.63± 0.08**	0.54± 0.05**	0.80± 0.07**
High dose group of cryptotanshinone	0.50± 0.05**	0.43± 0.05**	0.92± 0.08**
F	59.958	42.551	153.403
P	0.000	0.000	0.000

Note: The same as Table 2.

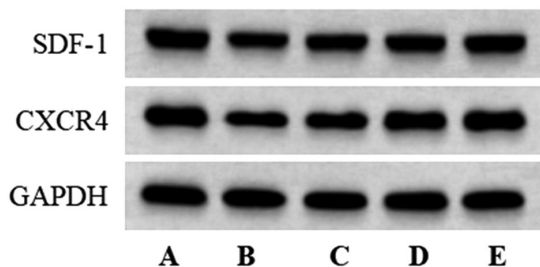


图 3 western blot 检测 HBMSC 细胞 SDF-1/CXCR4 通路蛋白表达

Fig.3 Western blot detection of SDF-1/CXCR4 pathway protein expression in HBMSC cells

Note: A: Control group; B: Model group; C: Low dose group of cryptotanshinone; D: Medium dose group of cryptotanshinone; E: High dose group of cryptotanshinone.

药物抑制氧化应激对于临床移植 BMSC 修复组织至关重要。

隐丹参酮具有显著的抗氧化作用,在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤中,可抑制氧化应激,减少心肌细胞凋亡^[17];在百草枯诱发的帕金森病模型中通过抑制氧化应激,提高神经元存活率,发挥神经保护作用^[18]。氧化应激表现为明显的脂质过氧化产物 MDA 与抗氧化系统 SOD、GSH 之间的失衡,MDA 大量释放,过度消耗抗氧化物质^[19]。在本研究中模型组 MDA 大量释放,SOD、GSH 活性下降,模型建立成功。氧化应激与细胞凋亡密切相关,ROS 大量产生,引发线粒体功能障碍,最终导致细胞凋

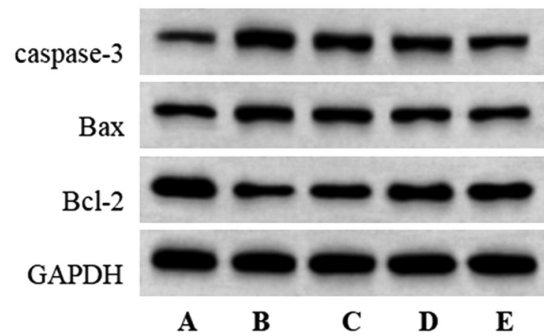


图 2 Western blot 检测 HBMSC 细胞凋亡蛋白表达

Fig.2 Western blot detection of apoptosis protein expression in HBMSC cells

Note: A: Control group; B: Model group; C: Low dose group of cryptotanshinone; D: Medium dose group of cryptotanshinone; E: High dose group of cryptotanshinone.

亡^[20]。caspase-3、Bax、Bcl-2 是与细胞凋亡相关的主要蛋白,Bax 与 Bcl-2 的比值显著降低,使线粒体膜通透性降低,细胞色素 C 进入线粒体的量减少,导致凋亡率降低,并减少了 caspase-3 执行的下游凋亡功能的激活,从而抑制细胞凋亡^[21]。本研究中模型组细胞凋亡率上升,与 Saleem R 等^[22]的研究一致;凋亡相关蛋白 caspase-3、Bax 表达上升,Bcl-2 表达下降,提示 H₂O₂ 通过调节凋亡蛋白水平导致 HBMSC 细胞凋亡。经过不同剂量隐丹参酮处理模型细胞,氧化应激状态得到改善,细胞凋亡也明显减少,caspase-3、Bax 表达下降,Bcl-2 表达明显升高,呈现剂量依赖性,高剂量隐丹参酮对氧化应激损伤的改善效果最好。糖酵解代谢对于人类多能干细胞的生物能学、生物合成能力和表观遗传调节至关重要,有氧糖酵解可以促进 ATP 产生,还可以使营养物质转化为生物合成前体并促进生物能量的积累^[23]。本研究中模型组细胞葡萄糖摄取量和乳酸含量较对照组明显下降,提示其有氧糖酵解功能受损,而隐丹参酮各剂量组尤其是隐丹参酮高剂量组较模型组明显提高了葡萄糖摄取量和乳酸含量,改善有氧糖酵解功能,对于促进 HBMSC 细胞存活增殖具有重要意义。

在氧化应激、严重缺氧和营养能量缺乏的环境下,间充质干细胞会在移植过程中发生凋亡,而组织损伤部位的血管网络丧失导致代谢废物清除率低,使这种情况进一步恶化^[24]。SDF-1 广泛参与了对细胞外基质、炎症因子及软骨下骨稳态的调控,SDF-1 可以激活 CXCR4 促进干细胞成骨分化,在骨关节炎中

表 6 HBMSC 细胞 SDF-1/CXCR4 通路蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Comparison of SDF-1/CXCR4 pathway protein expression in HBMSC cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	SDF-1/GAPDH	CXCR4/GAPDH
Control group	1.21± 0.05	1.33± 0.06
Model group	0.52± 0.08 [#]	0.62± 0.11 [#]
Low dose group of cryptotanshinone	0.68± 0.10*	0.85± 0.10*
Medium dose group of cryptotanshinone	0.85± 0.13**	1.02± 0.12**
High dose group of cryptotanshinone	1.03± 0.10**	1.21± 0.08**
F	49.042	51.632
P	0.000	0.000

Note: The same as Table 2.

发挥重要作用^[25]。SDF-1/CXCR4 信号通路通过改善细胞对应激的迁移、重塑和存活,在维持骨髓基质干细胞的增殖和存活方面具有重要作用^[26]。在骨重塑中,SDF-1/CXCR4 信号通路可调节 BMSC 的成骨分化、成骨蛋白如 ALP、OCN 和 OSX 的表达以及成骨细胞的形成^[27]。有研究发现,SDF-1 预处理子宫内膜再生细胞(从人类经血中获得的间充质样基质细胞),可以降低 MDA 的水平,增加 SOD 在组织中的表达,改善氧化应激,抑制细胞凋亡^[28]。本研究中,使用不同剂量隐丹参酮预处理 HBMSC 细胞,均提高了细胞中 SDF-1 和 CXCR4 蛋白表达和 SOD、GSH 活性,降低了 MDA 水平,抑制氧化应激,减少细胞凋亡,其中高剂量隐丹参酮的效果最好。提示隐丹参酮对于 HBMSC 细胞起保护作用,可能与激活 SDF-1/CXCR4 通路有关。

综上所述,隐丹参酮可能通过激活 SDF-1/CXCR4 通路,在氧化应激环境下发挥抗氧化作用,抑制 BMSC 细胞的凋亡。但本研究只是初步探讨隐丹参酮与过氧化氢诱导细胞凋亡的关系,其细胞凋亡途径复杂,还需要进一步研究氧化应激诱导的细胞凋亡的机制,为隐丹参酮保护 BMSC 细胞提供更充分的理论参考。另外,后续研究将通过过表达或抑制 SDF-1/CXCR4 观察隐丹参酮对过氧化氢诱导的骨髓间充质干细胞凋亡的影响,以完善隐丹参酮的作用机制。

参考文献(References)

[1] 杨春丽,陆金芝,刘贝贝,等.大鼠骨髓间充质干细胞的原代培养及鉴定[J].现代生物医学进展,2023,23(18):3425-3430.
 [2] 谢霖,秦庆庆,杨杜斌,等.骨髓间充质干细胞成软骨分化机制研究进展[J].中国运动医学杂志,2022,41(4):314-319.
 [3] Lin H, Sohn J, Shen H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing[J]. Biomaterials, 2019, 40(203): 96-110.
 [4] 侯著法,赵冰洁,刘松山,等.基于氧化应激的对香豆酸对多发性骨髓瘤细胞凋亡的影响[J].中国实验血液学杂志,2023,31(2):435-441.
 [5] Liu JW, Wu YL, Wei W, et al. Effect of warm acupuncture combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on cartilage tissue in rabbit knee osteoarthritis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 18(2021): 5523726.
 [6] 刘亚谊,张俊平.隐丹参酮抗纤维化及其机制研究进展[J].药学实践与服务,2023,41(3):146-148,186.
 [7] Li K, Song J, Zhao Q, et al. Effective component of *Salvia miltiorrhiza* in promoting cardiomyogenic differentiation of human placenta?

derived mesenchymal stem cells [J]. Int J Mol Med, 2018, 41 (2): 962-968.
 [8] Wang W, Huang M, Hui Y, et al. Cryptotanshinone inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by regulating ERK and NF-κB signaling pathways[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(5): 7333-7340.
 [9] 王广阔,张秀智,王伟丹,等.骨髓间充质干细胞旁分泌对成骨细胞生物学活性的影响[J].实用骨科杂志,2021,27(8):713-718.
 [10] Guo X, Ma R, Wang M, et al. Novel perspectives on the therapeutic role of cryptotanshinone in the management of stem cell behaviors for high-incidence diseases[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 971444.
 [11] 王志霞,莫碧文,牛坤汀,等.SDF-1/CXCR4 轴在间充质干细胞归巢机制中的研究进展 [J]. 现代生物医学进展,2016,16(10):1995-1997.
 [12] 唐志爱,郭世燕,黄建波.丹参酮II A 通过激活 SDF-1/CXCR4 轴对大鼠急性心肌梗死的保护作用 [J]. 实用药物与临床,2020,23(11):969-974.
 [13] 李露壮,姜衍,徐爱华,等.虾青素对过氧化氢诱导的骨髓间充质干细胞氧化应激的保护作用 [J]. 中国医科大学学报,2021,50(2):124-129.
 [14] Arthur A, Gronthos S. Clinical application of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells to repair skeletal tissue [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9759.
 [15] 袁大江,彭吾训,张飞,等.低浓度过氧化氢预处理增强骨髓间充质干细胞抗氧化应激损伤的能力[J].中国组织工程研究,2019,23(13):1982-1988.
 [16] Zhao B, Peng Q, Wang D, et al. Leonurine protects bone mesenchymal stem cells from oxidative stress by activating mitophagy through PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Cells, 2022, 11(11): 1724.
 [17] Shi G, Wang Y, Yang J, et al. Effect of cryptotanshinone on measures of rat cardiomyocyte oxidative stress and gene activation associated with apoptosis[J]. Cardiorenal Med, 2021, 11(1): 18-26.
 [18] Sun JM, Agarwal S, Desai TD, et al. Cryptotanshinone protects against oxidative stress in the paraquat-induced Parkinson's disease model[J]. Environ Toxicol, 2023, 38(1): 39-48.
 [19] 魏春华,苏姍娜,李姝,等.褪黑素对存储期红细胞携氧功能、氧化应激水平的影响[J].中国老年学杂志,2023,43(9):2190-2194.
 [20] Modanloo M, Shokrzadeh M. Analyzing mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis: potential role of L-carnitine [J]. Iran J Kidney Dis, 2019, 13(2): 74-86.

- [8] Chaumonnot K, Masson S, Sikner H, et al. The HSP GRP94 interacts with macrophage intracellular complement C3 and impacts M2 profile during ER stress[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 114.
- [9] 买买提艾力·艾则孜, 杜宇奎, 买买提·依斯热依力, 等. 硫酸喹啉酚通过有机阴离子转运蛋白-3 和氧化应激诱导心肌肥大及纤维化的作用[J]. *中国医师杂志*, 2023, 25(10): 1484-1489.
- [10] Wu Y, Luo J, Song X, et al. Irisin attenuates angiotensin II-induced atrial fibrillation and atrial fibrosis via LOXL2 and TGF β 1/Smad2/3 signaling pathways[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2023, 26(6): 717-724.
- [11] 黄从新, 张澍, 黄德嘉, 等. 心房颤动: 目前的认识和治疗的建议-2018[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2018, 32(4): 315-368.
- [12] 中国研究型医院协会, 中国医师协会房颤专家委员会. 心房颤动外科治疗中国专家共识 2020 版[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2021, 37(3): 129-144.
- [13] Duytschaever M, De Potter T, Grimaldi M, et al. Paroxysmal Atrial Fibrillation Ablation Using a Novel Variable-Loop Biphasic Pulsed Field Ablation Catheter Integrated With a 3-Dimensional Mapping System: 1-Year Outcomes of the Multicenter insPIRE Study [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2023, 16(3): e011780.
- [14] Reddy VY, Dukkipati SR, Neuzil P, et al. Pulsed Field Ablation of Paroxysmal Atrial Fibrillation: 1-Year Outcomes of IMPULSE, PEFCAT, and PEFCAT II [J]. *JACC Clin Electrophysiol*, 2021, 7(5): 614-627.
- [15] 段洁莹, 杨鹏, 王越, 等. NLR 对心房颤动伴心力衰竭患者射频消融术后心房颤动复发的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2022, 50(11): 1074-1079.
- [16] Zhu Z, Wang W, Cheng Y, et al. The predictive value of heart rate variability indices tested in early period after radiofrequency catheter ablation for the recurrence of atrial fibrillation [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2020, 31(6): 1350-1355.
- [17] 赵伟伟, 葛建敏, 王文珊, 等. 血清脑钠肽, 高敏 C 反应蛋白, 可溶性生长刺激表达基因 2 在阵发性心房颤动患者射频消融术后复发的预测价值[J]. *疑难病杂志*, 2023, 22(9): 924-928.
- [18] Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, et al. Indoxyl sulfate enhances endothelin-1-induced contraction via impairment of NO/cGMP signaling in rat aorta [J]. *Pflugers Arch*, 2021, 473(8): 1247-1259.
- [19] 孙敏敏, 邢雨蒙, 郭瑶, 等. 硫酸喹啉酚对维持性血液透析患者左心功能的影响[J]. *中华超声影像学杂志*, 2020, 29(11): 934-940.
- [20] Salyers ZR, Coleman M, Balestrieri NP, et al. Indoxyl sulfate impairs angiogenesis via chronic aryl hydrocarbon receptor activation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(2): C240-C249.
- [21] Luo J, Wu Y, Zhu X, et al. LOXL2 silencing suppresses angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through the EMT process and TGF- β 1/Smad3/NF- κ B pathway [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25(8): 964-969.
- [22] Zhao Y, Tang K, Tianbao X, et al. Increased serum lysyl oxidase-like 2 levels correlate with the degree of left atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(6): BSR20171332.
- [23] Wu Y, Can J, Hao S, et al. LOXL2 Inhibitor Attenuates Angiotensin II-Induced Atrial Fibrosis and Vulnerability to Atrial Fibrillation through Inhibition of Transforming Growth Factor Beta-1 Smad2/3 Pathway[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2022, 51(2): 188-198.
- [24] Erasmus M, Samodien E, Lecour S, et al. Linking LOXL2 to Cardiac Interstitial Fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5913.
- [25] 孙陈琛, 邵晨, 杜荣增. LOXL2 与心血管疾病关系的研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2022, 50(4): 618-620, 624.
- [26] Alsina KM, Hulsurkar M, Brandenburg S, et al. Loss of Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit PPP1R3A Promotes Atrial Fibrillation[J]. *Circulation*, 2019, 140(8): 681-693.
- [27] 倪敏舒, 陈丽, 鲍焱, 等. 内质网分子伴侣 GRP94 对伪狂犬病毒增殖的调节作用[J]. *浙江农业学报*, 2022, 34(11): 2386-2394.
- [28] Ma JL, Guo WL, Chen XM. Overexpressing microRNA-150 attenuates hypoxia-induced human cardiomyocyte cell apoptosis by targeting glucose-regulated protein-94[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4181-4186.
- [29] 王培, 马虎, 杨颖, 等. 白藜芦醇通过 Zn²⁺ 促进自噬发挥心肌细胞保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(6): 1048-1054.

(上接第 2644 页)

- [21] Hua P, Liu J, Tao J, et al. Influence of caspase-3 silencing on the proliferation and apoptosis of rat bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxia[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2): 1624-1633.
- [22] Saleem R, Mohamed-Ahmed S, Elnour R, et al. Conditioned medium from bone marrow mesenchymal stem cells restored oxidative stress-related impaired osteogenic differentiation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13458.
- [23] Luengo A, Li Z, Gui DY, et al. Increased demand for NAD relative to ATP drives aerobic glycolysis[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(4): 691-707.
- [24] Jiang Q, Huang K, Lu F, et al. Modifying strategies for SDF-1/CXCR4 interaction during mesenchymal stem cell transplantation [J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2022, 70(1): 1-10.
- [25] Wang W, Ha C, Lin T, et al. Celastrol attenuates pain and cartilage damage via SDF-1/CXCR4 signalling pathway in osteoarthritis rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70(1): 81-88.
- [26] Peyvandi AA, Roozbahany NA, Peyvandi H, et al. Critical role of SDF-1/CXCR4 signaling pathway in stem cell homing in the deafened rat cochlea after acoustic trauma [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(1): 154-160.
- [27] Wang Y, Bai S, Cheng Q, et al. Naringenin promotes SDF-1/CXCR4 signaling pathway in BMSCs osteogenic differentiation [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2021, 59(1): 66-73.
- [28] Jin W, Zhao Y, Hu Y, et al. Stromal Cell-Derived Factor-1 Enhances the Therapeutic Effects of Human Endometrial Regenerative Cells in a Mouse Sepsis Model[J]. *Stem Cells Int*, 2020, 12(2020): 4820543.