

酰胺类局麻药对脂肪来源间充质干细胞成软骨能力的影响

吴涛 宋海新 李扬政 李建华

浙江大学医学院附属邵逸夫医院康复医学科, 杭州 310018

通信作者: 李建华, Email: jianhua_li@zju.edu.cn

【摘要】 目的 探讨不同种类酰胺类局麻药对脂肪起源间充质干细胞成软骨能力影响。**方法** 分离培养四月龄新西兰大白兔脂肪起源干细胞 (ADMSCs) 并向软骨方向诱导分化。取贴壁生长的第三代软骨方向分化 ADMSCs, 分别用磷酸缓冲液 (对照组)、1%利多卡因 (1%利多卡因实验组)、2%甲哌卡因 (2%甲哌卡因实验组)、0.5%布匹卡因 (0.5%布匹卡因实验组) 和 0.5%罗哌卡因 (0.5%罗哌卡因实验组) 浸泡 30 min、60 min。5 组在各时间点处理完成后, 洗去局麻药, 重新加入软骨方向诱导分化培养液, 分别于培养第 3 天和第 7 天后采用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 并行番红-固绿染色评估软骨分化形态学变化, 筛选出毒性最小的局麻药。将筛选出的毒性最小的一种局麻药稀释至 25%, 50%, 75%, 100% 的浓度分别与软骨分化方向 ADMSCs 接触 30 min 和 60 min, 然后洗去局麻药重新加入软骨方向诱导分化培养液, 在培养第 3 天和第 7 天后采用实时荧光定量 (qPCR) 和 Western blot 法检测软骨分化相关基因 collagen I、collagen III、SOX9 的表达, 明确其对 ADMSCs 成软骨能力的影响。**结果** 软骨方向分化的 ADMSCs 与对应的局麻药物接触后, 1%利多卡因实验组、2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组软骨方向分化的 ADMSCs 凋亡率较对照组均显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。软骨分化方向 ADMSCs 与以上 4 个实验组接触 60 min 后的细胞凋亡率均高于组内接触 30 min 后, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 个实验组培养第 3 天后的细胞凋亡率高于组内培养第 7 天后, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。1%利多卡因处理组的细胞凋亡率低于 2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步研究显示, 与不同浓度利多卡因接触后, collagen I、collagen III、SOX9 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着利多卡因浓度和接触时间的增加, 其表达量的降低更为显著, 细胞成软骨受到的影响也更大。**结论** 酰胺类局部麻醉药可抑制 ADMSCs 的软骨分化能力, 且呈现时间-浓度依赖性。在等效工作浓度的酰胺类局麻药中, 1%的利多卡因对 ADMSCs 的软骨分化能力影响较其他酰胺类局麻药小。

【关键词】 干细胞; 局麻药; 细胞毒性; 再生医学

基金项目: 浙江省自然科学基金 2016 年面上项目 (LY16H170001)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.04.002

The cytotoxicity of local anesthetics to mesenchymal stem cells during early chondrogenic differentiation

Wu Tao, Song Haixin, Li Yangzheng, Li Jianhua

Department of Rehabilitation Medicine, Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China

Corresponding author: Li Jianhua, Email: jianhua_li@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective To identify the cytotoxicity of different local anesthetics (LAs) to the adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) during early chondrogenic differentiation. **Methods** Adipose-derived stem cells (ADMSCs) were isolated from 4-month old New Zealand white rabbits, and cultured and induced to differentiate into cartilage. The third generation chondrogenic differentiating ADMSCs were isolated and incubated with 1% lidocaine, 2% methylpivacaine, 0.5% bupivacaine and 0.5% ropivacaine, respectively, for 30 min and 60 min, so as to screen out the LA of least toxicity. Control cells were incubated in phosphate buffer. The LAs were washed away and the chondrogenic differentiation medium was added to promote differentiation. Apoptosis and morphological changes during the chondrogenic differentiation were measured using flow cytometry and safranin-fast green double dyeing on the 3rd and 7th days of the culturing. The least toxic LA was diluted to 25%, 50%, 75% and 100% of the original concentration and incubated with ADMSCs for 30 and 60 minutes. On days 3 and 7 after the exposure, a quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blotting were employed to analyze the expression of chondrogenesis-related genes including the collagen I, collagen III and SOX9. **Results** Apoptosis increased

significantly after the lidocaine, ropivacaine, bupivacaine and mepivacaine treatments compared to the PBS control. LAs are cytotoxic to rADMSCs during early chondrogenesis in a type- and time-dependent manner. Lidocaine was the least toxic LA tested. The chondrogenesis-related markers all decreased significantly by days 3 and 7 after the exposure to lidocaine at different concentrations compared with the control group. **Conclusions** LAs are cytotoxic to ADMSCs during early chondrogenesis in a dose- and time-dependent manner. 1% lidocaine was the least toxic LA tested.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Local anesthetics; Cytotoxicity; Regenerative medicine

Fund program: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (grant LY16H170001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.04.002

肌骨系统退行性变是造成疼痛和失能的重要原因^[1]。近年来兴起的干细胞治疗技术是处理此类疾患有效的方法之一,其治疗作用已为许多研究所证实^[2]。随着干细胞治疗在临床的逐步推广,许多和干细胞治疗同时使用的药物是否会对干细胞的功能造成影响也逐步引起了人们的注意。关节内注射酰胺类局麻药在很多临床操作中广为使用,因此我们在使用干细胞修复关节软骨、韧带时,干细胞和酰胺类局麻药就有可能在一定的时间、空间共存。已有研究显示,利多卡因和罗哌卡因可以加速脂肪来源间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)凋亡并抑制其成骨分化能力^[3]。但是不同种类酰胺类局麻药对于 ADMSCs 软骨分化能力的影响还未见报道。

本研究采用不同种类、浓度的局部麻醉药对 ADMSCs 进行干预,观察其对 ADMSCs 软骨分化能力的影响,为临床安全利用 ADMSCs 治疗提供实验依据。

材料与方法

一、主要试剂及仪器

主要试剂:达尔伯改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)-F12(美国 Hyclone 公司)和 10%胎牛血清,0.25%的胰蛋白酶(中国上海奥克化学有限公司),成软骨诱导培养液——包括 DMEM/F12(美国 Hyclone 公司),0.1 μmol/L 地塞米松(美国 Sigma 公司),50 μg/ml 维生素 C,10 ng/ml TGF-β1(美国 Peprotech 公司),6.25 μg/ml 胰岛素(中国上海奥克化学有限公司, CAS: 9004-10-8),6.25 μg/ml 转铁蛋白(美国 Sigma 公司)。Annexin V-FITC/PI 试剂盒(中国南京凯基生物, KGA108),番红 O 染料(中国北京索莱宝科技有限公司),固绿染料(中国江莱生物, CAS:2353-45-9),Real time-PCR 试剂盒(中国北京全式金生物技术有限公司, AQ131-01),Western blot 所用抗体(美国 Abcam 公司)。

主要仪器:饱和湿度的培养箱(美国 Thermo Scientific 公司, SW-CJ-1FD 型),倒置显微镜(德国 Leica 公司, IX51 型),流式细胞仪检测(美国 BD 公司, Accuri C6 型),实时荧光定量 PCR 仪(美国 Eppendorf 公

司, X226488N 型),电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)。

二、实验动物及分组

四月龄新西兰大白兔(上海斯莱克实验动物有限责任公司)1 只。分离培养 ADMSCs 并向成软骨方向诱导分化。将第三代软骨方向分化的 ADMSCs 分成按照处理药物的不同分成 5 组,包括对照组[用磷酸缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)处理]和 1%利多卡因实验组、2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组,每组均有 3 个重复样本。

三、实验方法

1. 细胞分离、培养:用 3%戊巴比妥钠以 1 ml/kg 体重对新西兰大白兔行耳缘静脉注射麻醉,无菌状态下切取兔腹股沟区皮下脂肪组织,用 PBS 反复冲洗,再除去脂肪组织膜和血管,最后剪成 1 mm³ 大小的碎块。用 0.075% I 型胶原酶 37 ℃ 消化 1 h, 200 目纱网过滤以除去细胞外间质及大块碎片, 1200 r/min 离心 15 min。用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液调整细胞密度至 1×10⁵/ml,接种于培养瓶中,放置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。24 h 后首次换液,以后每 3 d 换液 1 次,每日在倒置显微镜下观察细胞形态和生长情况。

2. 成软骨分化诱导:当贴壁细胞长满瓶底壁面积的 70%~80%后用 0.25%的胰蛋白酶消化、传代。取第三代分离培养出的脂肪起源间充质干细胞,加入成软骨诱导培养液培养 2 周。培养箱环境为 37 ℃、CO₂ 浓度 5%,培养基每周更换 2~3 次。将第三代软骨方向分化的 ADMSCs 接种于 6 孔板中以供后续实验。

3. 酰胺类局麻药物毒性筛选:1%利多卡因实验组、2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组根据与软骨分化方向 ADMSCs 接触的时间,再分为接触 30 min 和接触 60 min 各 2 个亚组(每个亚组 3 孔)。对照组(仅加入 PBS)、1%利多卡因组、2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组于对应的时间点与软骨分化方向 ADMSCs 接触后,用 PBS 将局麻药物洗脱,然后重新加入成软骨诱导培养液,于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中培养,分别于培养后第 3 天和第 7 天采用流式细胞术检测细胞凋亡情况,并行番红-固绿染色评估软骨分化形态学变化。

4. 优选酰胺类局麻药的毒性评估:根据前期实验结果,从上述 4 种局麻药中优选出毒性最小的一种局麻药,稀释成 25%、50%、75%、100% 的原药液浓度,分别与软骨方向分化的第三代 ADMSCs 接触 30 min 和 60 min,接触完成后,用 PBS 将局麻药物洗脱,再重新加入成软骨诱导培养液,于 5% CO₂、37 °C 环境培养箱中培养,分别于培养后第 3 天和第 7 天进行实时荧光定量(real time polymerase chain reaction, qPCR)(引物序列见表 1)和 Western blot 检测软骨分化相关基因(collagen I、collagen III、SOX9)的表达水平。

表 1 引物序列

引物名称	序列 5-3
SOX9-F	TCTGGAGACTGCTGAACGAG
SOX9-R	CTGCCCCATTCTTACCGACTT
collagen I -F	CTGGCCCTAATGGATTGCT
collagen I -R	TCACCCCTTAGGTCCCTTGGT
collagen III -F	TGGAGACTGGGAAACATGC
collagen III -R	CAGAGTCCGTCCACCACTTC
GAPDH-F	ACTGCTGAACGAGAGCGAGAA
GAPDH-R	CTGCCCCATTCTTACCGACTTC

四、统计学分析

应用 SPSS 11.0 版统计学软件进行数据分析,计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、酰胺类局麻药物毒性筛选结果

图 1 可见,与对照组比较,1%利多卡因实验组、2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组的细胞凋亡率均显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。软骨分化方向的 ADMSCs 与以上 4 个实验组接触 60 min 后的细胞凋亡率显著高于组内接触 30 min 后,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。4 个实验组培养第 3 天后的细胞凋亡率显著低于组内培养第 7 天后,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。综合各时间点细胞凋亡率检测结果,1%利多卡因凋亡率要低于 2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

图 2 为各组细胞番红-固绿染色结果。软骨细胞表现为红色阳性结果,阳性程度减弱表示成软骨能力降低。结果可见,与对照组比较,1%利多卡因实验组、2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组细胞的红色阳性表达均略有减弱,但并不明显。软骨分化方向的 ADMSCs 与以上 4 个实验组接触 60 min 后其细胞阳性表达低于组内接触 30 min 后。从染色结果看,1%利多卡因对细胞成软骨能力影

响要弱于 2%甲哌卡因实验组、0.5%布匹卡因实验组和 0.5%罗哌卡因实验组。综合以上结果,选择 1%利多卡因作为后续实验药物。

二、优选酰胺类局麻药的毒性评估

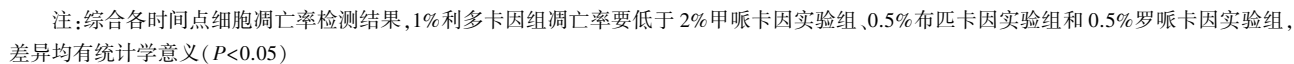
图 3 可见,与对照组比较,与不同浓度利多卡因接触后,软骨分化方向的 ADMSCs 的 collagen I、collagen III、SOX9 的 mRNA 表达均显著降低,且利多卡因的浓度越高,其表达降低更为明显,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。接触 60 min 后,25%、50%、75%、100%利多卡因组 collagen I、collagen III、SOX9 mRNA 的表达均低于对应浓度接触 30 min 后,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,25%、50%、75%、100%利多卡因组与软骨分化方向 ADMSCs 后,细胞 collagen I、collagen III 和 SOX9 蛋白表达均明显降低,且随着利多卡因浓度和处理时间的增加,表达降低幅度也更为明显,细胞成软骨能力受到的影响也更大。

讨 论

本研究结果显示,酰胺类局部麻醉药可明显抑制 ADMSCs 的软骨分化能力,且呈现时间-浓度依赖性。在等效工作浓度的酰胺类局麻药中,1%的利多卡因对 ADMSCs 的软骨分化能力的影响较其他酰胺类局麻药小。

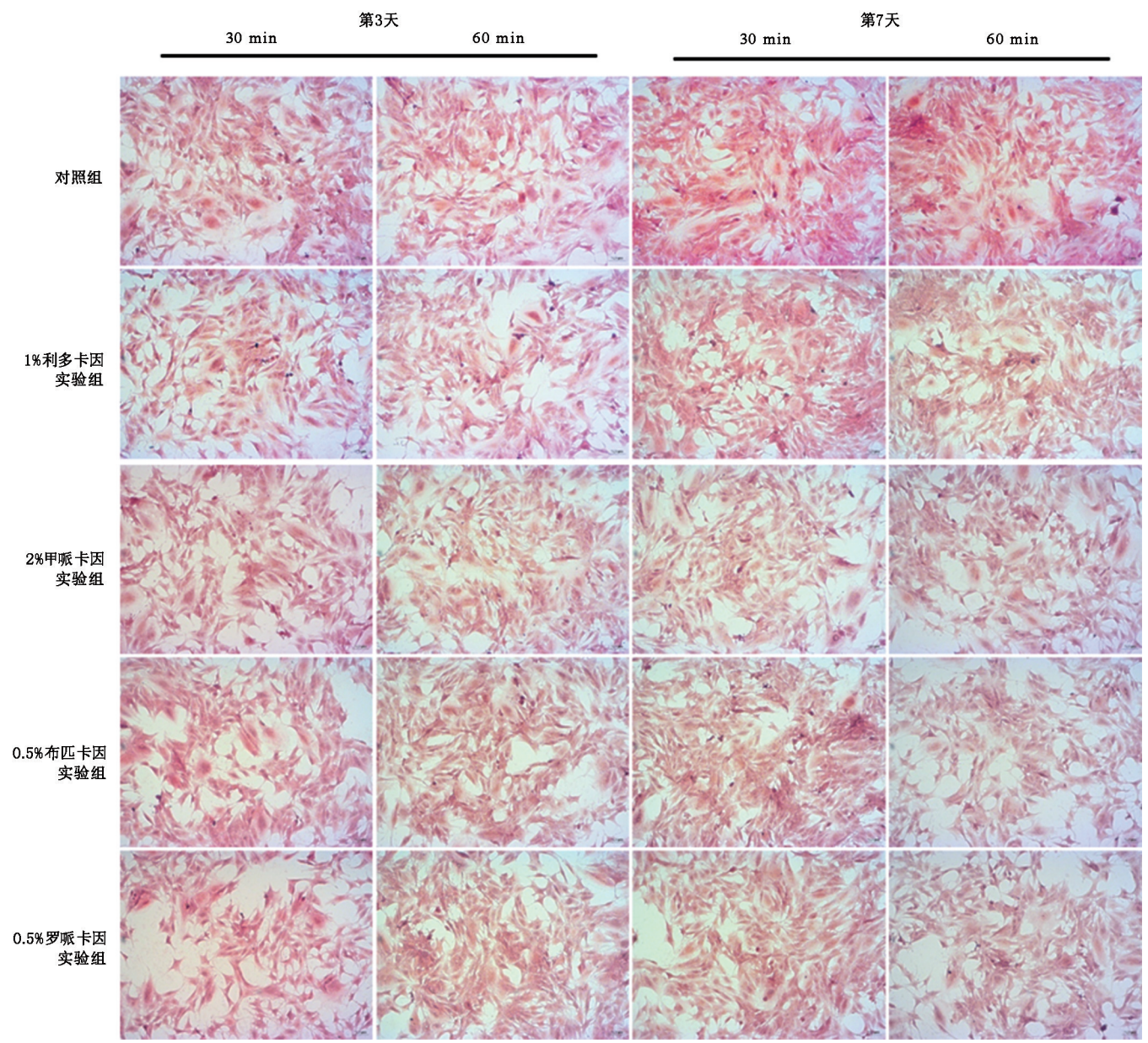
根据国外的研究数据显示,骨关节炎的总患病率约为 15%,其中 40 岁人群的患病率为 10%~17%,60 岁以上则达 50%,而在 75 岁以上人群中约 80%患有骨关节炎^[4-5]。近年来兴起的干细胞治疗等再生医学手段,为此类疾病的治疗提供了有力的武器^[6]。值得关注的是,在治疗过程中与干细胞同时使用的药物对干细胞分化能力的潜在影响。

细胞治疗关节软骨缺损的方法包括关节腔内注射干细胞^[7]以及直接移植包含有干细胞的支持物^[8]。在这些治疗情况下,干细胞有可能和先前注射的局麻药存在于同一个微环境中。有研究显示,关节软骨经利多卡因作用后,随着作用时间延长和浓度增加,软骨细胞的活性明显降低^[9]。同等效力工作浓度下布匹卡因对关节软骨的细胞毒性明显强于罗哌卡因和利多卡因^[10]。Keck 等^[11]发现,2%利多卡因对脂肪前体细胞分化为脂肪细胞之能力的影响强于其他酰胺类局麻药。之所以产生不同的结果,首先是因为不同学者采用的药物浓度不同,其次在不同的研究中细胞种类以及分化方向也不尽相同。这些实验条件的不同导致了不同甚至矛盾的研究结果。因此本研究的优势在于采用等效的工作浓度,即 1%利多卡因、2%甲哌卡因、0.5%布匹卡因和 0.5%罗哌卡因,并且选取了脂肪起源干细胞向软骨分化的途径。这使得不同种类的酰胺类局麻药对于 ADMSCs 的细胞毒性具有了可比性。



迄今为止,有三种机制来解释酰胺类局麻药对于细胞的毒性作用。首先,局部麻醉药的毒性作用已被证明与亲脂性有关^[12]。罗哌卡因和布比卡因是高度亲脂性分子,而利多卡因仅有轻微的亲脂性^[13]。研究

表明,人类白血病细胞与酰胺类局麻药接触会导致细胞死亡,如布比卡因和罗哌卡因主要引起坏死,而利多卡因会诱导 DNA 片段化和细胞凋亡^[14];其次,干细胞对局部麻醉药的抗增殖作用非常敏感,如抑制



注:软骨细胞表现为红色阳性结果,阳性程度减弱表示成软骨能力降低。从染色结果看,利多卡因对细胞成软骨能力影响最弱

图 2 软骨分化方向 ADMSCs 与不同种类酰胺类局麻药接触 30 min、60 min 后第 3 天和第 7 天的结果(番红-固绿染色,×200)

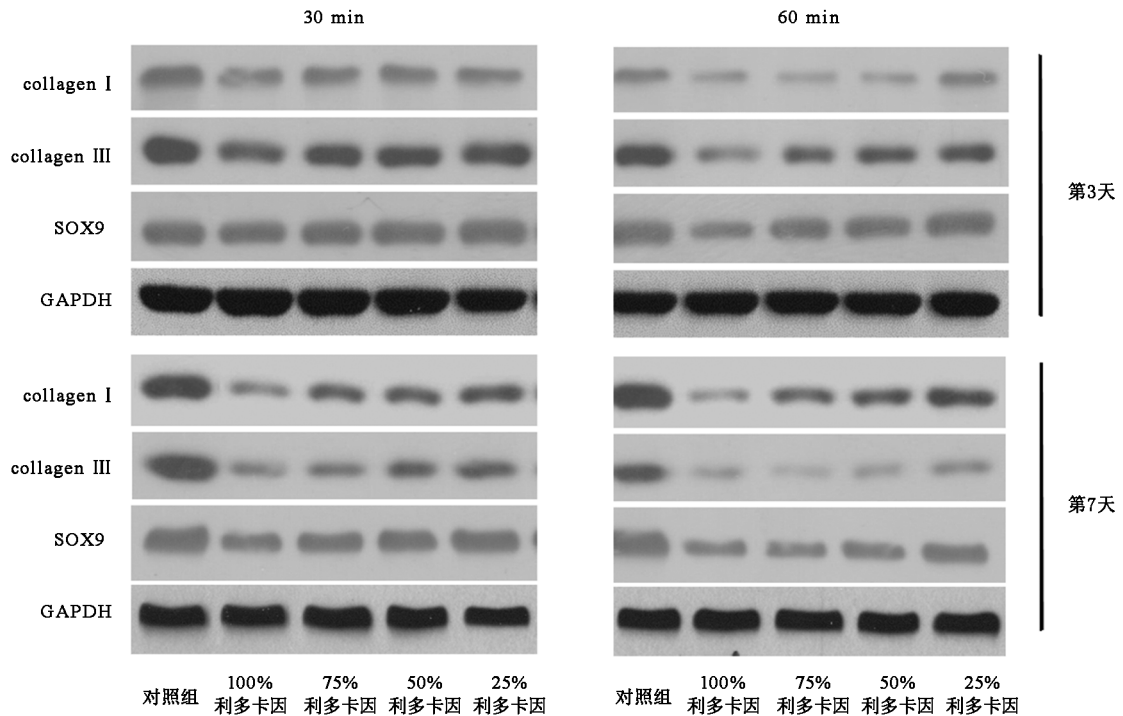
IκB-NF-κB-ICAM-1 信号转导通路,使细胞与细胞之间的有效通讯减弱,抑制线粒体呼吸^[15];第三,酰胺类局麻药还可能影响炎症过程,如布比卡因可诱导一氧化氮合酶活性,提示布比卡因毒性可能部分归因于持续炎症过程中一氧化氮的生成^[16]。本研究结果提示,即使是与酰胺类局麻药短时间(30 min 和 60 min)接触,也可加速 ADMSCs 在软骨分化途径经中的凋亡,软骨分化方向相关基因(collagen I、collagen III 和 SOX9)表达也明显减少,且其抑制效应可持续一周。

关节软骨主要是由一些基质成分组成,以 collagen III 和糖胺聚糖(glycosaminoglycan)为主。虽然关节中软骨细胞相对较少,但其基因却可调节软骨细胞外基

质的产生。由于关节软骨的血供特点,损伤后很难修复再生。本研究结果显示,酰胺类局麻药对软骨分化方向 ADMSCs 的 collagen I、collagen III 和 SOX9 表达有明显抑制作用,ADMSCs 成软骨能力受到了影响,但是其具体机制还需要进一步的研究。

本研究还存在一些不足:由于是在体外进行的,不能完全模拟体内药物的降解情况,药物的毒性作用可能会被夸大,因此需要进一步的体内实验来评估局麻药对干细胞活力的影响。

综上所述,酰胺类局部麻醉药可抑制 ADMSCs 的软骨分化能力,且呈现时间-浓度依赖性。在等效工作浓度的酰胺类局麻药中,1%的利多卡因对 ADMSCs 的



注:随着利多卡因浓度和处理时间的增加,软骨分化方向 ADMSCs 的 collagen I、collagen III、SOX9 蛋白表达也随之降低

图3 软骨分化方向 ADMSCs 与不同稀释度的利多卡因接触 30 min、60 min 后培养第 3 天和第 7 天 collagen I、collagen III、SOX9 蛋白表达的结果

软骨分化能力的影响较其他酰胺类局麻药小。因此在干细胞治疗肌骨系统疾病的临床实践中,需要优先选择那些对于干细胞毒性小的药物,且选择合适的药物浓度,以便使酰胺类局麻药对于干细胞软骨分化能力的影响降到最低。

参 考 文 献

- [1] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2010; 380(9859): 2163-2196. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61729-2.
- [2] Oehme D, Goldschlager T, Ghosh P, et al. Cell-based therapies used to treat lumbar degenerative disc disease: a systematic review of animal studies and human clinical trials[J]. Stem Cells Int, 2015, 2015: 946031 DOI:10.1155/2015/946031.
- [3] 张谦, 程世翔, 杨震, 等. 不同局部麻醉药对脂肪间充质干细胞凋亡及成骨分化的影响[J]. 中国医药, 2015, 10(1): 126-130. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4777.2015.01.031.
- [4] Cushnaghan J, Dieppe P. Study of 500 patients with limb joint osteoarthritis. I. Analysis by age, sex, and distribution of symptomatic joint sites [J]. Ann Rheum Dis, 1991; 50(1): 8-13. DOI: 10.1136/ard.50.1.8.
- [5] Adebajo AO. Pattern of osteoarthritis in a west african teaching hospital[J]. Ann Rheum Dis, 1991, 50(1): 20-22.
- [6] 美丽, 刘少英, 刘福艳, 等. 脂肪组织来源干细胞治疗骨关节炎研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2016, 37(2): 102-105. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2016.02.009.
- [7] Xia P, Wang X, Lin Q, et al. Efficacy of mesenchymal stem cells injection for the management of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis [J]. Int Orthop, 2015, 39(12): 2363-2372. DOI: 10.1007/s00264-015-2785-8.

- [8] Loken S, Jakobsen RB, Aroen A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in a hyaluronan scaffold for treatment of an osteochondral defect in a rabbit model [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008, 16(10): 896-903. DOI: 10.1007/s00167-008-0566-2.
- [9] 昌斌, 王东, 陈占昆, 等. 利多卡因对关节软骨培养模型中软骨细胞活性的影响[J]. 中国骨与关节杂志, 2013(3): 167-170. DOI: 10.3969/j.issn.2095-252X.2013.03.012.
- [10] Piper SL, Kramer JD, Kim HT, et al. Effects of local anesthetics on articular cartilage[J]. Am J Sports Med, 2011, 39(10): 2245-2253. DOI: 10.1177/0363546511402780.
- [11] Keck M, Zeyda M, Gollinger K, et al. Local anesthetics have a major impact on viability of pre-adipocytes and their differentiation into adipocytes[J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 126(5): 1500. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3181ef8beb.
- [12] Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, et al. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line[J]. Br J Anaesth, 2009, 103(5): 711-718. DOI: 10.1093/bja/aep236.
- [13] Grouselle M, Tueux O, Dabadie P, et al. Effect of local anaesthetics on mitochondrial membrane potential in living cells [J]. Biochem J, 1990, 271(1): 269-272.
- [14] Onizuka S, Yonaha T, Tsuneyoshi I. Local anesthetics with high lipophilicity are toxic, while local anesthetics with low pka induce more apoptosis in human leukemia cells [J]. J Anesth Clin Res, 2011, 2(1): 1. DOI: 10.4172/2155-6148.1000116.
- [15] Fu X, Han B, Cai S, et al. Migration of bone marrow-derived cells induced by tumor necrosis factor-alpha and its possible role in wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(2): 185-191. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2009.00454.x.
- [16] Feinstein DL, Murphy P, Sharp A, et al. Local anesthetics potentiate nitric oxide synthase type 2 expression in rat glial cells[J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2001, 13(2): 99-105.

(修回日期: 2019-03-03)

(本文编辑: 阮仕衡)