

异补骨脂素对去卵巢骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞作用机制研究

王剑¹ 陈天宇² 王钢^{3*} 格日勒图¹

1. 内蒙古自治区人民医院创伤骨科, 呼和浩特 010010

2. 南方医科大学第三附属医院, 广州 510630

3. 南方医科大学南方医院, 广州 510515

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 08-0980-05

摘要: 目的 探讨异补骨脂素对去卵巢骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)作用机制。方法 18 只 C57/BL6 雌鼠随机平均分为假手术组(Sham)、去卵巢组(OVX)和去卵巢加异补骨脂素组(OVX + ISO), 各组 6 只。OVX 组和 OVX + ISO 组分离背部近髂脊处肌肉, 取出双侧卵巢, 结扎上部输卵管, 剪去双侧输卵管。Sham 组相同入路后剪去包裹卵巢周围的部分脂肪组织。OVX + ISO 组在去卵巢前 5 天开始灌胃异补骨脂素, 灌胃剂量为 20 mg/(kg·d), 灌胃持续时间 2 个月, Sham 组以等剂量生理盐水灌胃。造模后 12 周处死小鼠, 取股骨下段评价骨髓腔中脂肪细胞量, 行 micro-CT 扫描评价股骨下段骨量改变及 RUNX2、PPAR- γ 免疫荧光检测。结果 异补骨脂素能明显减少由于去卵巢引起的股骨下段脂肪细胞增多; 与此同时, 异补骨脂素治疗能明显改善由于去卵巢引起的股骨下段骨量丢失, 即 OVX + ISO 组骨小梁厚度(Tb. Th)、骨体积/总体积(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)大于 OVX 组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而 OVX + ISO 组骨小梁体积(Tb. Sp)小于 OVX 组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段进行 RUNX2 和 PPAR- γ 免疫荧光提示, 异补骨脂素治疗能增加股骨下段由于去卵巢引起的 RUNX2 表达降低, 同时能抑制 PPAR- γ 表达增加, 即 OVX + ISO 组股骨下段 RUNX2、PPAR- γ 免疫荧光表达强度高于 OVX 组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 异补骨脂素对去卵巢小鼠 BMSCs 的作用机制为治疗骨质疏松提供了新的临床治疗手段。

关键词: 异补骨脂素; 骨髓间充质干细胞; 骨质疏松; 小鼠

The effects of isopsoralen on bone marrow mesenchymal stem cells of mice with ovariectomized osteoporosis and the relevant mechanisms

WANG Jian¹, CHEN Tianyu², WANG Gang^{3*}, Geriletu¹

1. Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010010

2. Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630

3. Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: WANG Gang, Email: wgfr@163.com

Abstract: Objective To study the effects of isopsoralen on bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of mice with ovariectomized osteoporosis and to explore the relevant mechanisms. **Methods** Eighteen C57/BL6 female rats were randomly divided into sham operation group (sham), ovariectomized group (OVX) and ovariectomized plus isopsoralen group (OVX + ISO), with 6 rats in each group. In the OVX group and OVX + ISO group, surgery was performed from the back of the proximal iliac spine muscle, and bilateral ovaries were removed and the bilateral fallopian tubes cut off after the ligation of the upper fallopian tube. In the Sham group, part of the fat tissue around the ovary was removed after the same procedure. All rats of the OVX + ISO group was gavaged isopsoralen at a dose of 20 mg/(kg·d) for two months began 5 days before the removal of ovaries. All of the rats in the sham group were gavaged with equal dose of normal saline. After 12 weeks, rats were sacrificed to evaluate the quality of fat cells in the bone marrow cavity. Bone mass of femur was evaluated by micro-CT scan and RUNX2 and PPAR- γ were also

基金项目: 国家自然科学基金(81560368); 内蒙古自治区人民医院院内基金(201428); 内蒙古自治区人民医院博士科研启动资金(CBS201532)

* 通讯作者: 王钢, Email: wgfr@163.com

assessed. **Results** Isoporsalen can significantly decrease the increase in fat cells resulted from ovariectomized in OVX mice. In addition, isoporsalen treatment can significantly reduce the loss of bone mass due to ovariectomized in the lower femur. Trabecular bone thickness (Tb. Th), bone volume / total volume (BV/TV) and trabecular number (Tb. N) were all significant greater ($P < 0.05$) in the OVX + ISO group than those in the OVX group; and bone trabecular separation (Tb. SP) was significant lower ($P < 0.05$) in the OVX + ISO group than that in the OVX group. The Runx2 and PPAR- γ immune fluorescence tips in the lower femur of C57/BL6 mice showed that isoporsalen treatment could increase Runx2 expression that was decreased due to ovariectomy, and inhibit increased expression of PPAR- γ , namely the immune fluorescence expression intensities of Runx2 and PPAR- γ in lower femur were significant higher in the OVX + ISO group than that of OVX group ($P < 0.05$). **Conclusion** Study the effects and mechanisms of isoporsalen treatment on BMSCs in ovariectomized mice provides a new avenue for the treatment of osteoporosis.

Key words: Isoporsalen; Bone mesenchymal stem cells; Osteoporosis; Mice

绝经后骨质疏松发病率高、危害性大^[1]。绝经后雌激素的减少可激活和增殖 T 细胞,促进破骨细胞的形成,使骨量减少,骨小梁变细,小梁间隙增宽,发生骨质疏松^[2-3]。目前临床上治疗通过降低破骨细胞的骨质吸收作用或提高成骨细胞成骨能力来影响患者骨量。近年来中药在治疗骨质疏松方面的优势越来越受关注。本文通过观察中药异补骨脂素对模拟绝经后骨质疏松,即去卵巢小鼠骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨分化能力的影响,从而探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备

异补骨脂素 (纯度 > 99%, 分子量 186.1635, Sigma, USA), α -MEM 培养基 (Gibco, USA), 牛血清白蛋白 (BSA)、青-链霉素溶液 (P/S)、IBMX、 β -甘油磷酸钠、维生素 C、二甲基亚砜 (DMSO) (Santa Cruz, USA), Micro-CT (SCANCO Medical AG 瑞士), -80℃ 超低温冰箱 (SANYO-MDFU50V, 日本 Sanyo 公司)。

1.2 动物分组与模型建立

18 只 C57/BL6 雌鼠随机平均分为假手术组 (Sham)、去卵巢组 (OVX) 和去卵巢加异补骨脂素组 (OVX + ISO), 各组数量 6 只。OVX 组和 OVX + ISO 组分离背部近髂脊处肌肉, 取出双侧卵巢, 结扎上部输卵管, 剪去双侧输卵管。Sham 组相同入路后剪去包裹卵巢周围的部分脂肪组织。OVX + ISO 组在去卵巢前 5 天开始灌胃异补骨脂素, 灌胃剂量为 20 mg/(kg·d), 灌胃持续时间 2 个月, Sham 组以等剂量生理盐水灌胃。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 骨标本收集: 术后喂养 3 个月, 断颈处死小鼠, 取两侧股骨、胫骨, 仔细剔除周围附着的肌肉等软组织, 同时将左侧股骨放入含有 0.1% 叠氮钠的

生理盐水中, 备骨组织微结构测定; 右侧股骨用于免疫组织化学、免疫荧光检测 RUNX2 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ) 蛋白表达以及组织形态学分析。

1.3.2 股骨下段 HE 染色: 取实验鼠股骨 4% 中性多聚甲醛常温固定, 漂洗后进行脱钙, 4℃ 脱钙 21 天, 每 3 天更换 1 次脱钙液, 每隔 3 天观察脱钙过程, 股骨弯曲至 90° 认为脱钙完全即可终止。将已经完成脱钙的标本漂洗、组织脱水、石蜡包埋、切片、烤片, 进行 HE 染色。

1.3.3 脂肪细胞定量分析: 普通光学显微镜对股骨下段干骺端进行拍照, 定量脂肪细胞, 分析参数为: 脂肪细胞数量 (AD#, per mm²), 总脂肪细胞面积占骨髓腔比例 (AV/TV)。所有切片均由 3 个不同人统一拍摄同一区域, 拍摄顺序由图片左下角干骺端向右将图片平均分割呈 3 个区域进行拍摄, 然后从图片左上角皮质骨内向右将图片分割成 3 个区域进行拍摄, 进行脂肪细胞计数时不包括已被破坏的脂肪细胞。分析时为避免对最终结果产生偏倚, 所有图均未知标本的各自分组 (Sham, OVX 或者 OVX + ISO 组)。

1.3.4 股骨下段 Micro-CT 扫描: 股骨远端进行显微 CT (Scanco Medical, μ CT 80) 分析: 小鼠 CO₂ 麻醉, 股骨下端骨小梁较为明显和集中的区域通过显微 CT (μ CT) 分析和三维重建, 设置参数为扫描电压 70KV, 功率 30W, 扫描电流 429 μ A, 每次扫描厚度 5 μ m。分析数据包括: 骨小梁厚度 (Tb. Th)、骨小梁体积 (Tb. Sp)、骨体积 (BV)/总体积 (TV) 和骨小梁数量 (Tb. N)。

1.3.5 股骨下段 RUNX2、PPAR- γ 免疫荧光表达: 取去卵巢并灌胃异补骨脂素 C57/BL6 小鼠股骨, 保留膝关节和股骨中下段, 4% 中性多聚甲醛室温固定, 进行漂洗、脱钙、再漂洗、组织脱水、石蜡包埋、切片烤片、烤蜡、脱蜡、抗原修复、孵育抗体等, 后用含

DIPI 封片剂封片,避光保存 3 分钟后荧光共聚焦显微镜观察拍照,从上下左右中 5 个方位随机取 5 个非重叠视野,使用 Image-Pro Plus(IPP)软件计算平均光密度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行统计学分析。结果以均数 ± 标准差表示,采用单因素方差分析。首先进行方差齐性检验,若检测结果方差齐性,则组间多重比较采用 LSD 法;若方差不齐则采用组间多重比较 Dunnett'sT3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

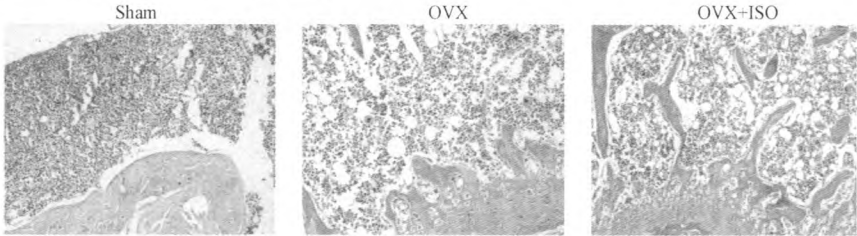


图 1 异补骨脂素对 C57/BL6 小鼠股骨下段脂肪细胞量的影响(股骨下段 HE 染色 ×20)

Fig.1 The effect of Isoporsoralen on the amount of adipocytes from distal femur of C57/BL6 mice(HE ×20)

2.2 异补骨脂素对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段骨量的影响

通过对各组 C57/BL6 小鼠股骨下段的显微 CT (Micro-CT)扫描提示,异补骨脂素治疗能明显改善由于去卵巢引起的股骨下段骨量丢失,即 OVX +

2 结果

2.1 异补骨脂素对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段骨髓腔中脂肪细胞量的影响

Sham、OVX、OVX + ISO 的脂肪细胞数量分别为 $(9.69 \pm 3.31) \text{ mm}^2$ 、 $(40.9 \pm 9.63) \text{ mm}^2$ 、 $(20.6 \pm 5.54) \text{ mm}^2$,异补骨脂素抑制去卵巢小鼠骨髓腔中脂肪细胞的增加,即 OVX + ISO 组脂肪细胞数量低于 OVX 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 1)。

ISO 组 Tb. Th、BV/TV、Tb. N 大于 OVX 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而 OVX + ISO 组 Tb. Sp 小于 OVX 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1,图 2。

表 1 异补骨脂素对 C57/BL6 小鼠股骨下段骨量的影响(n = 6)

Table 1 The effect of Isoporsoralen on bone mass of distal femur in C57/BL6 mice(n = 6)

组别	骨小梁厚度(Tb. Th)	骨小梁体积(Tb. Sp)	骨体积/总体积(BV/TV)	骨小梁数量(Tb. N)
Sham	$0.06 \pm 0.02^+$	$0.44 \pm 0.19^+$	$0.25 \pm 0.10^+$	$3.95 \pm 0.52^+$
OVX	0.02 ± 0.01	0.50 ± 0.14	0.05 ± 0.03	1.04 ± 0.29
OVX + ISO	$0.04 \pm 0.02^+$	$0.47 \pm 0.26^+$	$0.17 \pm 0.05^+$	$3.61 \pm 0.72^+$
	F = 17.98	welch = 17.54	welch = 13.13	F = 52.59
P 值	0.00012	0.00021	0.00051	0.00048

注: * 为 OVX + ISO 与 OVX 组相比较, $P < 0.05$; + 为 Sham 组与 OVX 组相比较, $P < 0.05$ 。

2.3 异补骨脂素对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段 RUNX2 和 PPAR-γ 表达的影响

对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段进行 RUNX2 和 PPAR-γ 免疫荧光提示,异补骨脂素治疗能增加股骨下段由于去卵巢引起的 RUNX2 表达降低,同时能抑制 PPAR-γ 表达增加,即 OVX + ISO 组股骨下段 RUNX2、PPAR-γ 免疫荧光表达强度高于 OVX 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2,图 3。

表 2 异补骨脂素对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段 RUNX2 和 PPAR-γ 表达的影响(n = 6)

Table 2 The effect of Isoporsoralen on RUNX2 and PPAR-γ expression at distal femur of C57/BL6 mice(n = 6)

组别	RUNX2(MOD)	PPAR-γ(MOD)
Sham	$30.6 \pm 5.61^+$	$30.6 \pm 5.61^+$
OVX	15.8 ± 3.25	15.8 ± 3.25
OVX + ISO	$25.4 \pm 3.82^+$	$25.4 \pm 3.82^+$

注: F = 17.973211, $P = 0.000104$; * 为 OVX + ISO 与 OVX 组相比较, $P < 0.05$; + 为 Sham 组与 OVX 组相比较, $P < 0.05$ 。

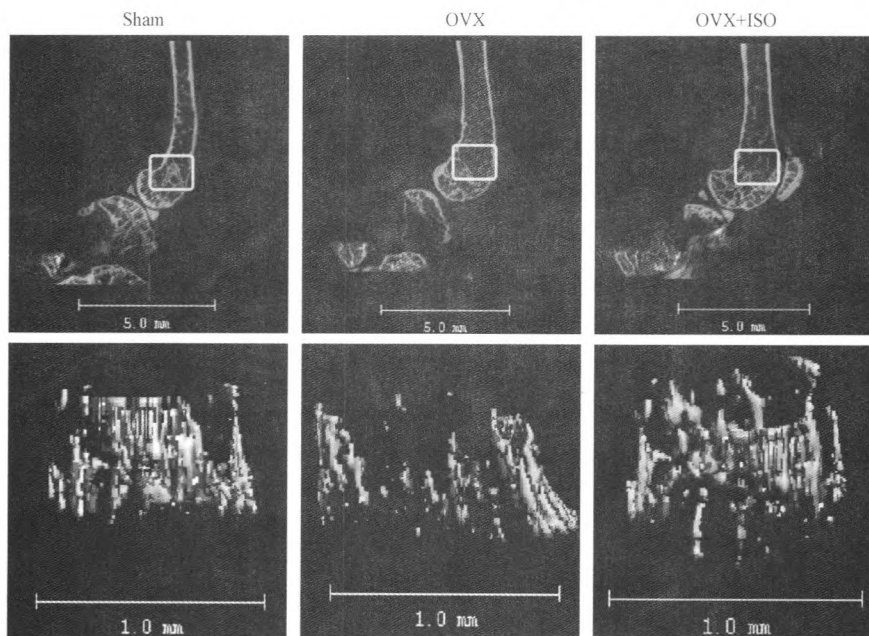


图 2 异补骨脂素对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段骨量的影响
Fig. 2 The effect of Isopsoralen on bone mass of distal femur in C57/BL6 mice

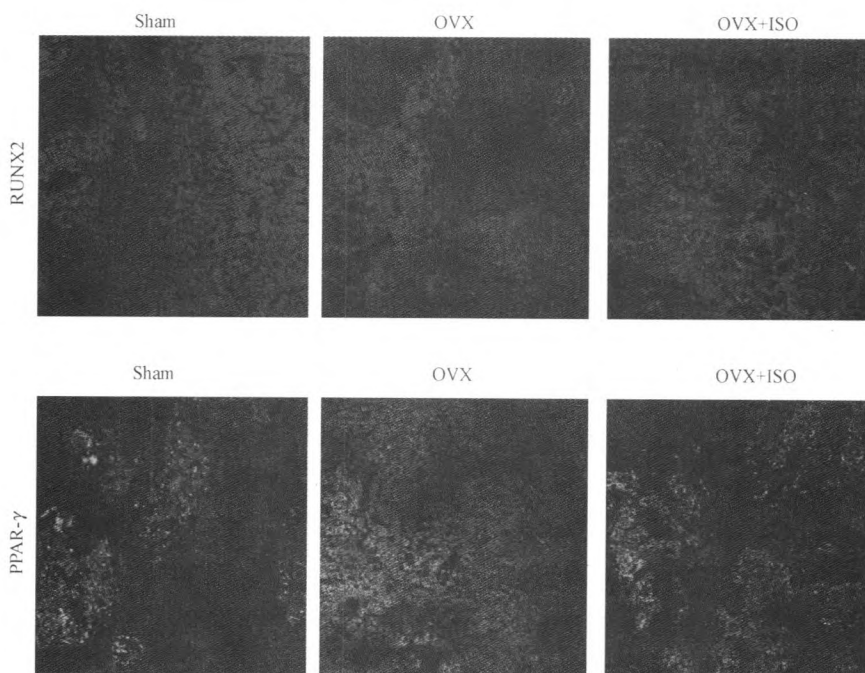


图 3 异补骨脂素对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段 RUNX2 和 PPAR- γ 表达的影响 ($\times 20$)
Fig. 3 The effect of Isopsoralen on RUNX2 and PPAR- γ expression at distal femur of C57/BL6 mice ($\times 20$)

3 讨论

大量研究发现骨质疏松的骨质中骨量降低和骨髓腔中脂肪组织的增加具有相关性。目前认为成骨细胞和骨髓腔中脂肪细胞来源于同一种前体细胞,即 BMSCs^[5]。绝经后妇女与未绝经妇女相比,其骨髓间充质干细胞产生分化成熟脂肪细胞的能力明显

增加。基础研究证实,成骨细胞和脂肪细胞具有可塑性,从人骨髓间充质干细胞来源分化成熟的成骨细胞在一定条件下可以去分化或分化转移为脂肪细胞,脂肪细胞也具有相同特性。这个现象提示在脂肪细胞和成骨细胞分化成熟过程中存在相互反作用的平衡关系。

核心结合蛋白因子 2 (RUNX2)是成骨细胞分

化的关键调控因子,在骨形成的过程中扮演重要的角色,目前大多数研究用核心结合蛋白因子 2 (RUNX2) 来衡量细胞成骨或成脂的能力^[6-7]。PPAR- γ 是脂肪细胞成熟过程中必需的细胞转录因子,它的表达强弱和活性高低可能会决定小鼠 BMSCs 向成骨细胞或是脂肪细胞分化。目前认为 PPAR- γ 是骨髓间充质干细胞在成骨细胞分化过程中起抑制成骨作用^[8],其机制是促进脂肪的形成^[9]。在成骨和成脂增殖和分化过程中,理论上存在这种截然相反的关系,即成骨细胞分化的启动是以牺牲脂肪细胞分化过程作为代价,而成骨细胞和脂肪细胞之间的平衡有众多的交叉信号通路调控,核心结合蛋白因子 2 (RUNX2) 和 PPAR- γ 是成骨分化和成脂分化过程中两个最重要的调控分子。

此外,脂肪细胞对成骨细胞具有脂毒性,脂肪细胞成脂分化的状态会影响成骨细胞的成骨能力和分化能力。在脂肪细胞和成骨细胞共培养实验中发现,脂肪细胞释放的游离脂肪酸能抑制成骨细胞成熟分化,并可诱导成骨凋亡。有文献报道骨髓腔中过量的脂肪组织不利于人体骨骼系统,临床上认为其是一个重要的负面风险因素。对于老年性骨质疏松而言,理想的治疗策略是在抑制骨髓腔中骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化成熟的同时增加其向成骨细胞转化的趋势,以此来提高机体的骨量。

异补骨脂素是补骨脂中提取的一种有效成分,属于一种香豆素类化合物。临床可用于骨质疏松、皮肤病如银屑病、白癜风、皮肤 T 细胞淋巴瘤、肿瘤、哮喘、前列腺增生等多种疾病的治疗^[10],其抗肿瘤作用机制可能与调节细胞内钙离子浓度,介导细胞凋亡有关^[10-11]。文献报道补骨脂素对骨骼健康的稳态起到很好的保护作用,但评价异补骨脂素对抗骨质疏松症的科学研究非常有限,所涉及到的细胞核分子机制尚未阐述。近年来研究报道异补骨脂素对体外培养的成骨细胞具有促增殖和分化的作用,其发挥促成骨作用的机制可能与植物雌激素样作用有关^[12-13]。

笔者研究证实经异补骨脂素灌胃处理 2 月的 C57/BL6 小鼠,能明显减少由于去卵巢引起的股骨下段脂肪细胞增多;与此同时,通过对各组 C57/BL6 小鼠股骨下段的显微 CT (Micro-CT) 扫描提示,异补骨脂素治疗能明显改善由于去卵巢引起的股骨下段骨量丢失,即 OVX + ISO 组 Tb. Th、BV/TV、Tb. N 大于 OVX 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);而 OVX + ISO 组 Tb. Sp 小于 OVX 组,差异具有统计学

意义 ($P < 0.05$)。对去卵巢 C57/BL6 小鼠股骨下段进行 RUNX2 和 PPAR- γ 免疫荧光提示,异补骨脂素治疗能增加股骨下段由于去卵巢引起的 RUNX2 表达降低,同时能抑制 PPAR- γ 表达增加,即 OVX + ISO 组股骨下段 RUNX2、PPAR- γ 免疫荧光表达强度高于 OVX 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究观察异补骨脂素对去卵巢小鼠 BMSCs 的作用机制为治疗骨质疏松提供了新的临床治疗手段。

【参 考 文 献】

- [1] Gordan GS, Vaughan C. Postmenopausal osteoporosis. Prim Care, 1974(1):565-582.
- [2] Genci S, Weitzmann MN, Roggia C, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T cell production of TNF- α . J Clin Invest, 2000, 106(10):1229.
- [3] Hao YJ, Gao K, Wang YS, et al. Effect of calcitonin on the proliferation and apoptosis of osteoclasts. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(28):5410.
- [4] Schurman L. GUÍAS 2012 para el diagnóstico, LA prevención y el tratamiento DE LA osteoporosis. Medicina, 2013, 21(6):73.
- [5] Songlin P, Ge Z, Yixin H, et al. Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone. Bone, 2009, 49(2):534-544.
- [6] Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, et al. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. Lab Invest, 2004, 84(4):479-484.
- [7] Liu LF, Shen WJ, Zhang ZH, et al. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: roles of PPARgamma and adiponectin. J Cell Physiol, 2010, 225(3):837-845.
- [8] Rosen ED, Troy AE, Bradwin G, et al. PPAR α is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Mol Cell, 1999, 4(4):611-617.
- [9] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell, 1994, 79(7):1147-1156.
- [10] Dong NB, Zhan BY, Xia YS, et al. Effect of psoralen on benign prostatic hyperplasia. Chin J Exp Surg, 2003, 20(2):109-110.
- [11] Cai Y, Chen B, Zhang RH, et al. Apoptosis of HL60 cell line induced by psoralen and its effect on intracellular Ca²⁺ concentration. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2006, 33(2):64-66.
- [12] Xin D, Wang H, Yang J, et al. Phytoestrogens from psoralea corylifolia reveal estrogen receptor-subtype selectivity. Phytomedicine, 2010, 17(2):126-131.
- [13] Wang JH, Wang Y, Pan YM. Effects of psoralen on proliferation and differentiation of cultured Osteoblasts in vitro. Natural Product Research and Development, 2008, 25(25):803-805.

(收稿日期: 2015-07-27)