

· 论 著 ·

骨碎补经骨髓间充质干细胞调节 OPG/RANKL/RANK 通路抑制破骨细胞的实验研究

张峻玮^{1,2} 李琰² 薛海鹏³ 李朝辉² 聂伟志² 徐展望^{3*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014

2. 山东省文登整骨医院, 山东 文登 260014

3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

中图分类号: R-332; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0617-08

摘要: **目的** 研究骨碎补作用绝经后骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)调节 OPG/RANKL/RANK 通路及对破骨细胞分化成熟的影响并探讨其可能的作用机制。**方法** 实验大鼠去双侧卵巢造模, 分为实验组(OVXDF, 造模+骨碎补水煎液灌胃)、模型组(OVX, 造模+0.9%生理盐水灌胃)、假手术组(SHAM, 假手术+0.9%生理盐水灌胃), 造模成功后提取 BMSCs, 将 BMSCs 和骨髓单核细胞共培养于 Transwell 小室的上室和下室, 分为实验组+破骨细胞(OVXDF+OC)、模型组+破骨细胞(OVX+OC)、假手术组+破骨细胞(SHAM+OC)。下室加入破骨细胞诱导剂, 倒置相差显微镜观察破骨细胞的分化成熟情况并计数, 酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测下室培养液中骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、RANKL 的含量, 实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法(Western blot)检测 BMSCs 中 Wnt10b、 β -catenin、RANKL、OPG mRNA 及蛋白表达并计算 RANKL/OPG。**结果** 在共培养系统中, 与去卵巢灌胃大鼠 BMSCs 共培养的破骨细胞(OVXDF+OC)数量较单纯模型组+破骨细胞(OVX+OC)明显减少($P<0.05$)。下室培养液 OPG 含量及共培养 BMSCs 中 Wnt10b、 β -catenin、OPG mRNA 及蛋白表达模型组+破骨细胞(OVX+OC)最低, RANKL 及 RANKL/OPG 最高, 经骨碎补灌胃后(OVXDF+OC)培养液中 OPG 含量及 BMSCs 细胞中 Wnt10b、 β -catenin、OPG mRNA 及蛋白表达明显升高, 培养液及 BMSCs 细胞中 RANKL 及 RANKL/OPG 明显降低($P<0.05$)。**结论** 骨碎补可调节 BMSCs 细胞 OPG、RANKL 的表达, 激活 OPG/RANKL/RANK 信号通路抑制破骨细胞的分化和成熟, 此作用可能与 BMSCs 的 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活有关。

关键词: 中医中药; 动物实验; 破骨细胞; 骨碎补; 骨髓间充质干细胞; 骨质疏松; 大鼠

Rhizoma drynaria inhibits osteoclasts by regulating OPG/RANKL/RANK of bone marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Junwei^{1,2}, LI Yan², XUE Haipeng³, LI Zhaoxue², NIE Weizhi², XU Zhanwang^{3*}

1. Postgraduate School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014

2. Wendeng Osteopathic Hospital in Shandong Province, Wendeng 264400

3. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China

* Corresponding author: XU Zhanwang, Email: xzw6001@163.com

Abstract: Objective To study the effect of rhizoma drynariae on OPG/RANKL/RANK signal path and osteoclast differentiation by bone marrow stromal cells (BMSCs) in postmenopausal osteoporotic rats, and to explore its possible mechanism. **Methods** Experimental rats were divided into experimental group (OVXDF, ovariectomized and rhizoma drynariae gavage), model group (OVX, ovariectomized and 0.9% NaCl gavage), and sham operation group (SHAM, sham surgery and 0.9% NaCl gavage). After successful modeling, BMSCs were extracted. BMSC and bone marrow mononuclear cells were co-cultured in the upper and lower chambers of the Transwell chamber, respectively. The co-cultured cells were divided into experimental group+osteoclasts (OVXDF+OC), model group+osteoclasts (OVX+OC), and sham operation group+osteoclasts (SHAM+OC). The differentiation

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473709); 山东省中医药科技发展计划项目(2017-431)

* 通信作者: 徐展望, Email: xzw6001@163.com

and maturation of osteoclasts were observed and counted with a phase-contrast microscope. OPG and RANKL in the culture medium of the lower chamber were detected using ELISA method. mRNA and protein expressions of Wnt10b, β -Catenin, RANKL, and OPG in BMSCs were detected using PCR and Western blotting. **Results** In the co-culture systems, the number of osteoclasts in OVXDF+OC group was significantly less than in OVX+OC group ($P<0.05$). OPG content in the culture medium of the lower chamber and the expression of wnt10b, β -Catenin, and OPG in the co-culture systems were the lowest, but RANKL and RANKL/OPG were the highest, in OVX+OC group. After rhizoma drynariae gavage, OPG content in OVXDF+OC medium and mRNA and protein expressions of Wnt10b, β -Catenin, and OPG in BMSCs increased significantly ($P<0.05$), but RANKL content and RANKL/OPG decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Rhizoma drynariae regulates the expression of OPG and RANKL, and activates OPG/RANKL/RANK signaling pathway to inhibit the differentiation and maturation of osteoclasts in BMSCs. This effect may be related to the activation of Wnt/ β -Catenin signaling pathway in BMSCs.

Key words: traditional Chinese medicine; animal experiment; osteoclasts; rhizoma drynariae; bone marrow mesenchymal stem cells; osteoporosis; rat

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量减低、骨显微结构退化, 骨强度降低为特征的骨代谢疾病。2010–2016 年, 我国老年人的整体发病率是 36%, 而在绝经后老年女性的发病率高达 49%^[1], 严重影响中老年人的健康。骨碎补是一味治疗骨质疏松的常用中药, 可以促进成骨^[2-3]; 也可以抑制破骨细胞的分化及成熟^[4], 但具体作用机制尚不完全明确。在本实验中, 笔者研究骨碎补对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrowstromal cells, BMSCs) Wnt/ β -Catenin 及 OPG/RANKL/RANK 信号通路的影响, 及其对破骨细胞分化、成熟的作用, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

分离 BMSCs 用实验动物, 为 6 月龄健康雌性 SD 大鼠 (SPF 级), 体重 (315.12 $\pm$ 8.96) g, 诱导培养破骨细胞用实验动物, 为出生 14~20 d 的 SD 大鼠。均购自朋悦 (济南) 公司, 合格证号: SCXK (鲁) 20140007。

1.2 试剂耗材

低糖 DMEM 培养基 (DMEM-LG) (美国 Hyclone 公司)、胎牛血清 (FBS) (美国 Hyclone 公司)、0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA (美国 Hyclone 公司)、TRIpure Reagent (批号 231527AX, 北京艾德莱生物科技有限公司)、Wnt10b、 β -Catenin、OPG、RANKL 及 GAPDH 抗体 (Abcam 公司)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥)、伊红染色液、苏木素染色液 (上海碧云天生物技术有限公司)、OPG、RANKL ELISA 试剂盒 (武汉基因美公司)、大鼠破骨细胞诱导培养基、大鼠破骨细胞完全培养基 (武汉普诺赛公司)。

1.3 主要仪器设备

研究用万能级显微镜 (OLYMPUS, 日本奥林巴斯公司)、CO₂ 培养箱 (上海力康发展有限公司)、实时荧光定量 PCR 仪 (LightCy-cler480II, 瑞士)、酶联免疫仪 (Biotek Elx800, 美国伯腾仪器有限公司)、微量紫外可见光分光光度计 (凯奥/K5600, 北京凯奥科技发展有限公司)、温度梯度 PCR 仪 (TP600, 日本 TAKARA)、垂直蛋白电泳仪 (VE-18618, 上海天能)、流式细胞仪 (FACSVE RSE, 美国 BD)、多色荧光成像系统 (Fusion Fx7, 法国 VILBER)、Transwell 小室 (北京康宁公司, 中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组、造模及鉴定: 背侧双切口切除双侧卵巢建立骨质疏松模型^[5], 假手术组仅摘除卵巢周围少量脂肪组织。术后适应性饲养 8 周, 健康大鼠随机分为 3 组, 各组 16 只, 分为实验组 (OVXDF)、模型组 (OVX)、假手术组 (SHAM)。实验组参考本课题组前期实验^[3], 根据动物与人体的每千克体重剂量折算后, 按照 4.8 g/只剂量给予骨碎补水煎液灌胃 (相当于人体千克体重每日用药的 10 倍), 模型组及假手术组用 0.9% 生理盐水 3.0 mL/只灌胃, 每日两次, 连续 12 周。灌胃结束时将大鼠麻醉, 使用 MEDILINK-MEDIX90 骨密度仪自带软件测量大鼠 L4~5、双侧股骨骨密度。

1.4.2 BMSCs 的分离培养、形态观察及鉴定: (1) BMSCs 分离及培养。采用全骨髓贴壁筛选法进行 BMSCs 的分离及培养, 倒置相差显微镜观察细胞增殖及形态变化并拍照, 待原代细胞增殖到 90% 融合时, 按 1:3 比例进行传代, 继续培养, 待细胞增殖到 90% 融合时, 再次传代培养。(2) BMSCs 鉴定。取各组融合状况优良的 P3 代 BMSCs, 消化、离心, 弃上层液体, 无菌 PBS 漂洗 2 遍, 用 2 mL PBS 重悬细

胞,平均分配到3个1.5 mL的EP管中,一管不加任何抗体作空白对照,另两管分别加入抗体CD44(Alexa Fluor 647)2 μ L、CD45(FITC)2 μ L并做好标记,4 $^{\circ}$ C避光孵育35 min,1 000 r/min,4 $^{\circ}$ C,离心5 min,无菌PBS清洗2遍后,制成500 μ L单细胞悬液,移入专用管中,上机分析CD44、CD45表达情况。

1.5 BMSCs与破骨细胞共培养体系的建立

采用分离骨髓单核细胞的方法获得破骨细胞前体细胞,将出生14~20 d的实验大鼠断颈处死,取股骨和胫骨,剪开骨髓腔,用MEM α 培养基多次冲洗,收集冲洗液,反复吹打,收集滤液,离心后弃上清液,保留细胞沉淀。将4 mL大鼠淋巴细胞分离液加入到离心管,其上加入已用4 mL MEM α 重悬细胞沉淀;离心后吸取中间白膜层细胞到15 mL离心管内,加入10 mL PBS稀释,再次离心,弃上清,保留细胞沉淀,用大鼠破骨细胞诱导培养基重悬细胞沉淀,按 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 种于6孔板的Transwell下室以破骨细胞诱导剂培养。将上述80%细胞融合的间充质干细胞制成细胞悬液,以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 加入6孔板上的Transwell上室进行培养。下室于共培养第3、5、7天以破骨细胞诱导培养基重换液,第9天更换大鼠破骨细胞完全培养基进行培养,此后每3 d换药一次。上室以BMSCs培养液同步换液。根据BMSCs来源将共培养细胞分为:实验组+破骨细胞(OVXDF+OC)、模型组+破骨细胞(OVX+OC)、假手术组+破骨细胞(SHAM+OC)。

1.6 破骨细胞形态观察、鉴定及计数

共培养后第3、7、12、16天于倒置相差显微镜下

观察下室细胞形态。共培养后第12天对下室细胞进行HE及TRAP染色(根据TRAP染色试剂盒说明)。

1.7 酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测共培养体系中的OPG、RANKL情况

共培养后第12天,收集Transwell下室细胞上清液,分别按照OPG、RANKL的ELISA试剂盒说明书操作,于450 nm波长检测各孔的光密度值并代入标准曲线计算蛋白质表达水平。

1.8 实时荧光定量PCR观察BMSCs Wnt10b、 β -catenin、RANKL、OPG mRNA及RANKL/OPG

共培养后第12天后,收集Transwell上室BMSCs,提取总RNA并检测纯度达标,取罗氏反转录试剂盒,按步骤冰上依次配置各组RNA反转录体系并于PCR仪中反应合成cDNA,配置20 μ L总体积的PCR反应体系(SYBR Green I 10 μ L,上游引物和下游引物各0.5 μ L,cDNA 2 μ L,DEPC水7 μ L)在LightCycler[®] 480设备中进行实时荧光定量PCR反应条件:①预变性:95 $^{\circ}$ C 10 min 1个循环;扩增循环:②扩增 95 $^{\circ}$ C 10 s;③退火 55 $^{\circ}$ C 10 s;④延伸 72 $^{\circ}$ C 20 s,②至④为45个循环;溶解曲线:⑤95 $^{\circ}$ C 5 s;⑥65 $^{\circ}$ C 60 s;⑦97 $^{\circ}$ C continuous,⑤至⑦为1个循环;保温:40 $^{\circ}$ C 10 s 1个循环。实验结束后,导出记录各样本的ct值,在Excel中以 β -actin作为内参基因对各组待测样品进行RNA总量校正,采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算各组基因的相对表达量,并进行统计学分析。目标基因引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

基因	序列	产物长度(bp)
Wnt10b	F:5'-CCCCGGGACATCCAGGCGAGAAT-3'	245
	R:5'-GGACGTAGGCGGGGCTGGAATACT-3'	
β -catenin	F:5'-TGGTGGGCTGCAGAAATGGTT-3'	246
	R:5'-ACGATGGCCGGCTTGTTC-3'	
OPG	F:5'-TCCCTTGGCCTGACTACTCTTAT-3'	260
	R:5'-GAACCCATCCGGACATCTTTT-3'	
RANKL	F:5'-CGAGCGCAGATGGATCCTAACAGA-3'	179
	R:5'-TCCCTTTGCACGGCCCTTGAA-3'	

1.9 蛋白质印迹法(Western blot)观察Wnt10b、 β -Catenin、RANKL、OPG的情况

共培养后第12天,收集Transwell上室BMSCs,消化、离心、重悬、再离心,去上清,入含PMSF的裂解液,冰上持续裂解30 min,离心取上清,BCA法测定蛋白浓度,添加蛋白上样缓冲液(5 $\times$),水浴锅

100 $^{\circ}$ C煮沸10 min,冰上降温,稍离心,-20 $^{\circ}$ C保存,制备凝胶,依次进行转膜,封闭,用稀释后的Wnt10b、 β -Catenin、OPG、RANKL、GAPDH抗体,摇床震荡1 h后,4 $^{\circ}$ C条件下过夜,次日洗涤后二抗孵育1 h,洗涤,加入显影液孵育2 min,在Bio-Rad凝胶成像分析系统中曝光保存图像后,通过Image J软

件对蛋白条带进行分析。

1.10 统计分析方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用完全随机设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度检查结果

灌胃 12 周后,OVX、OVXDF 组大鼠 L4~5 及双

侧股骨骨密度较 SHAM 组明显下降,以 OVX 组最低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明造模成功(见图 1)。

2.2 BMSCs 形态观察及鉴定

2.2.1 BMSCs 形态观察:BMSCs 培养至第 3 代时,细胞生长迅速,同时贴壁细胞成倍数增加,当细胞达到 80%~90% 融合时,其形态更加均一,呈纤维样或宽大扁平不规则样,排列密集紧凑,呈放射状或旋涡状(见图 2)。

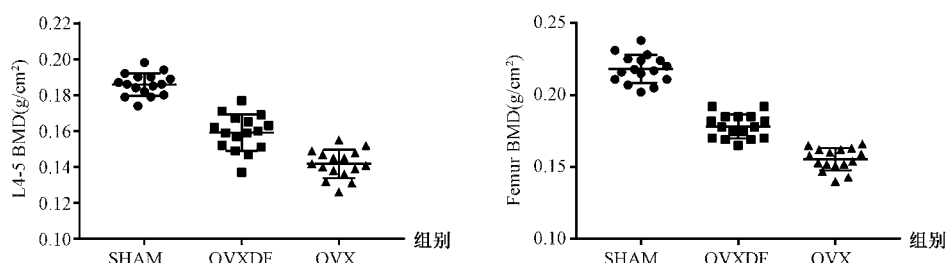


图 1 大鼠 L4~5 及双侧股骨骨密度

Fig.1 Bone mineral density L4-5 and the bilateral femurs in rats

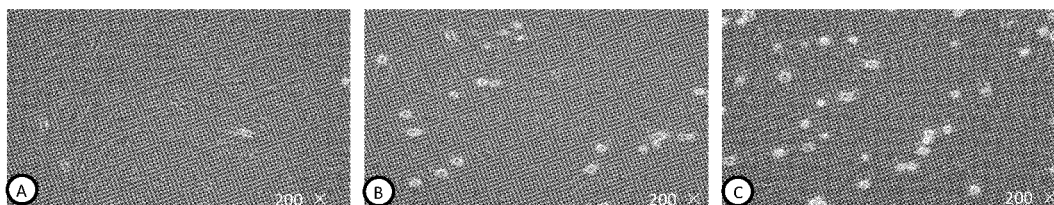


图 2 各组大鼠 BMSCs 第 3 代细胞形态 A:SHAM 组,B:OVXDF 组,C:OVX 组

Fig.2 The cell morphology of the third passage of BMSCs in rats of each group.A: SHAM; B: OVXDF; C: OVX

2.2.2 流式细胞仪检测:经流式分析检测,结果显示三组 BMSCs CD44 的表达率为阳性,CD45 的表达率为阴性。结合培养时细胞形态学的观察,说明本

实验采用全骨髓分离培养方法得到的 BMSCs 纯度较高,质量可靠。见图 3。

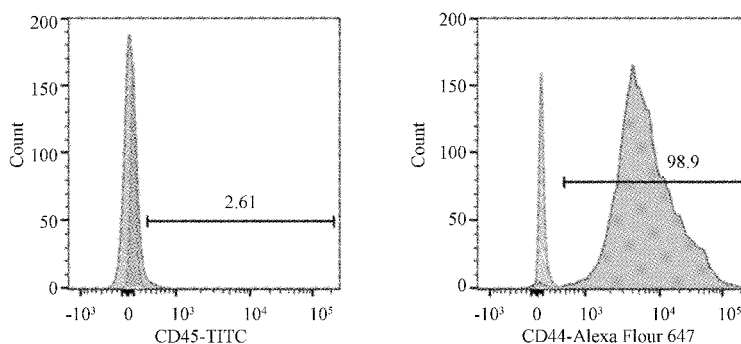


图 3 流式细胞仪鉴定结果

Fig.3 Results of flow cytometry

注:CD44 表达阳性,CD45 表达阴性。

2.3 破骨细胞的形态观察及鉴定

2.3.1 破骨细胞活体观察:倒置相差显微镜显示下室内单核细胞随着培养时间的延续逐渐融合呈周围有伪足,胞浆有空泡的多核细胞,数量逐渐增多,体

积及细胞核数增多,在混合培养后第7~9天达到高峰。三组比较 OVX+OC 多核细胞出现最早,个数最多,凋亡时间最晚, OVXDF+OC 组次之, SHAM+OC 组最低。见图4。

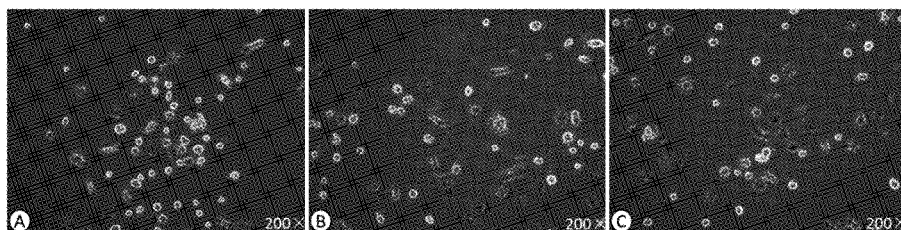


图4 破骨细胞的形态观察 A: SHAM+OC 组, B: OVXDF+OC 组, C: OVX+OC 组

Fig.4 Morphological observation of osteoclasts. A: SHAM+OC; B: OVXDF+OC; C: OVX+OC

2.3.2 破骨细胞的鉴定及计数:HE 染色可见破骨细胞呈浅粉红色,体积较大,胞浆颗粒均匀、细小,核仁染色呈浅蓝色,可见多个细胞核,细胞膜周围可见伪足(图5A)。TRAP 染色观察见破骨细胞体积较大,呈酒红色,胞质均匀,可见多核,核呈蓝色。周围可见伪足(图5B)。TARP 染色(+)、细胞核内可见多核,表明诱导所得细胞为破骨细胞。

在200倍镜下随机分析10个视野的TRAP(+)且胞内 ≥ 3 个细胞核的多核细胞数,显示与去卵巢后灌胃大鼠 BMSCs 共培养的破骨细胞(OVXDF+OC)数量较单纯模型组+破骨细胞(OVX+OC)明显减少。三组比较, SHAM+OC 组 $<$ OVXDF+OC 组 $<$ OVX+OC, 差异具有统计学意义($P<0.05$)(图5C)。

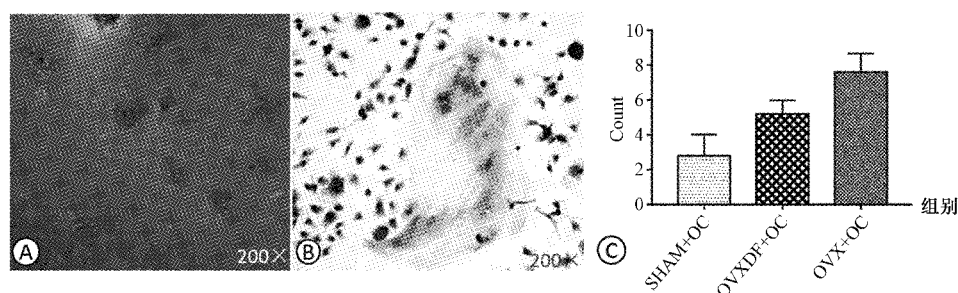


图5 破骨细胞鉴定及计数

Fig.5 Identification and counting of osteoclasts

2.4 Transwell 下室培养液中 OPG、RANKL 的含量

模型组+破骨细胞(OVX+OC)中抑制骨吸收的 OPG 含量最低,促进破骨细胞分化及成熟的 RANKL 含量最高。经骨碎补灌胃后(OVXDF+OC), OPG 含量明显升高, RANKL 含量明显降低。

三组比较, OPG 含量: SHAM+OC 组 $>$ OVXDF+OC 组 $>$ OVX+OC 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); RANKL 含量: SHAM+OC 组 $<$ OVXDF+OC 组 $<$ OVX+OC 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图6。

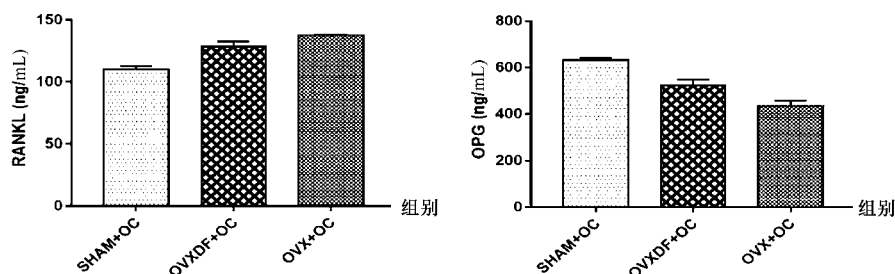


图6 各组大鼠 OPG、RANKL 含量

Fig.6 The content of OPG, RANKL in rats of each group

2.5 BMSCs 中 Wnt10b、 β -catenin、OPG、RANKL mRNA 测量

模型组+破骨细胞(OVX+OC)中 Wnt10b、 β -catenin、OPG mRNA 相对量最低, RANKL mRNA 相对量及 RANKL/OPG 最高, 灌胃后(OVXDF+OC) Wnt10b、 β -catenin、OPG mRNA 升高, RANKL mRNA、

RANKL/OPG 降低。三组比较, Wnt10b、 β -catenin、OPG mRNA: SHAM+OC 组>OVXDF+OC 组>OVX+OC 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。RANKL mRNA、RANKL/OPG: SHAM+OC 组<OVXDF+OC 组<OVX+OC 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 7。

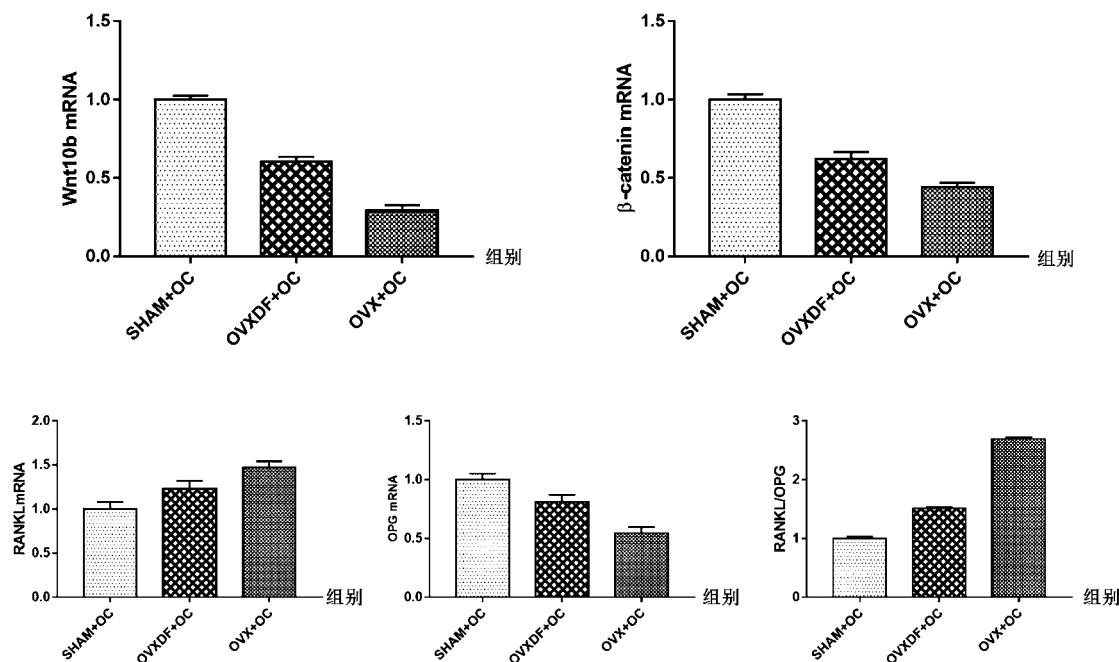


图 7 各组大鼠 Wnt10b、 β -catenin、OPG、RANKL mRNA 表达

Fig.7 mRNA expression of Wnt10b, beta-catenin, OPG, and RANKL in rats of each group

2.6 BMSCs 中 Wnt10b、 β -catenin、OPG、RANKL 蛋白表达情况

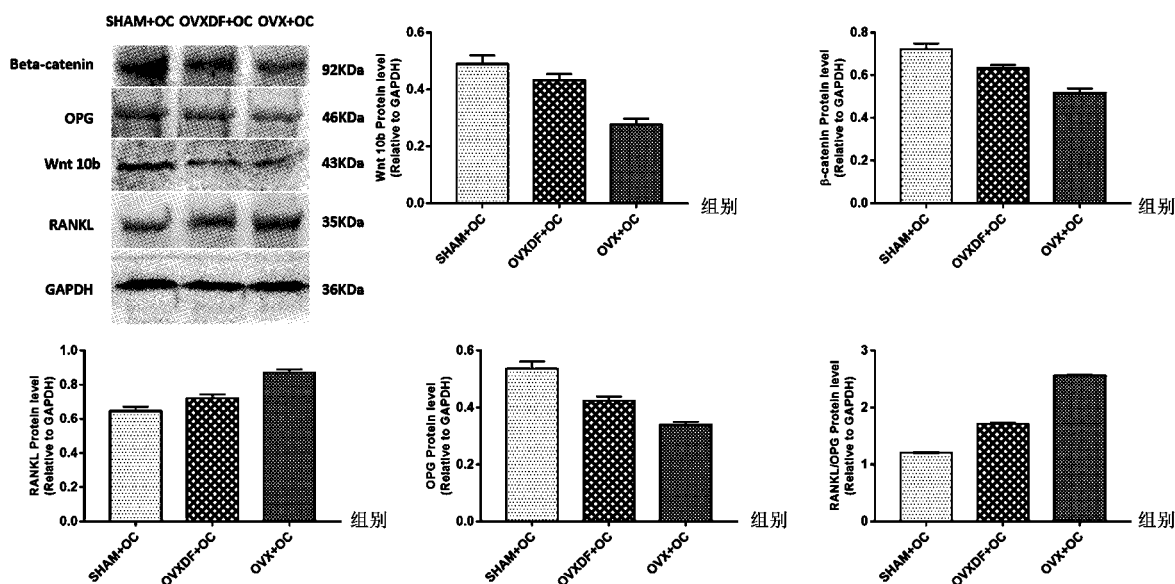
模型组+破骨细胞(OVX+OC)中 Wnt10b、 β -catenin、OPG 蛋白表达最低, RANKL 蛋白表达及 RANKL/OPG 最高, 灌胃后(OVXDF+OC) Wnt10b、 β -catenin、OPG 蛋白表达升高, RANKL 蛋白表达及 RANKL/OPG 降低。三组比较, Wnt10b、 β -catenin、OPG 蛋白表达: SHAM+OC 组>OVXDF+OC 组>OVX+OC 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。RANKL 蛋白表达及 RANKL/OPG: SHAM+OC 组<OVXDF+OC 组<OVX+OC 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 8。

3 讨论

3.1 BMSCs 与骨质疏松症

随着老龄社会的到来, 骨质疏松症已成为世界性健康问题, 其原因在于骨形成与骨吸收之间的失耦联。既往对骨质疏松症的研究多集中在成骨细

胞、破骨细胞及其相互关系^[6], 随着研究的深入, 与成骨细胞及破骨细胞共存于骨骼微环境中的 BMSCs 对骨代谢的作用逐渐得到重视^[7-9]。BMSCs 是一种具有多种分化潜能的成纤维样细胞, 在不同微环境下具有向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化的能力, 有骨修复潜能^[10], 在此过程中, Wnt/ β -catenin 信号通路起重要作用。研究表明, 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路可提高成骨关键因子 RUNX2 的表达^[11-12], 促进间充质干细胞的成骨分化^[13], 抑制其成脂及成软骨分化。同时, BMSCs 还可通过多种途径调控破骨细胞的分化、成熟及活性^[14-16], 其中, OPG/RANKL/RANK 信号通路是重要途径之一。OPG 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 主要由成骨细胞、骨髓间充质干细胞分泌。RANKL 可以与破骨细胞膜上的核因子 κ B 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK) 相结合, 激活 RANKL/RANK 信号通路, 调控破骨细胞的分化、成

图8 各组大鼠 Wnt10b、 β -catenin、OPG、RANKL 蛋白表达Fig.8 Protein expression of Wnt10b, β -catenin, OPG, and RANKL in rats of each group

熟及活性。OPG 亦可以与 RANK 相结合,与 RANKL 相竞争性,阻断 RANKL/RANK 信号通路的传导,起到抑制破骨细胞的作用。研究表明,在无或低浓度破骨细胞诱导因子的情况下,BMSCs 与破骨细胞前体细胞共同培养可促进破骨细胞的形成^[17];而在高浓度破骨细胞诱导因子作用下,BMSCs 对破骨细胞的分化、成熟起抑制作用^[18]。表明 BMSCs 对破骨细胞具有双重作用,而骨骼微环境会影响其对破骨细胞的调控。

3.2 骨碎补防治骨质疏松

骨碎补为水龙科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J.Sm 的干燥根茎,在祖国医学中,首见于《药性论》,其性味苦、温,归肝、肾经,具有活血续伤、补肾强骨的功效,主治跌打损伤或创伤,筋骨损伤,瘀滞肿痛;以及肾虚腰痛脚弱,耳鸣耳聋,牙痛,久泻等。常用剂量为 9~20 g,是日前治疗骨质疏松症常用中药之一^[19]。现代药理学研究发现其主要生物活性成分是黄酮类化合物,而柚皮苷又是其黄酮类化合物的主要成分^[20]。研究表明,骨碎补及其提取物可通过改善微循环^[21],调节雌激素^[22]、调节细胞的增值分化^[23-24]及调节信号通路等多种机制,防治骨质疏松。其中, Wnt/ β -catenin 和 OPG/RANKL/RANK 信号通路无疑是其调控的重要途径。骨碎补及其提取物可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进骨髓间充质干细胞的成骨分化,抑制其成脂分化^[25-26],通过 OPG/RANKL/RANK 调节破骨

细胞引起的骨吸收^[27-28]。

3.3 骨碎补通过调节 BMSCs 分泌 OPG、RANKL 调控破骨细胞的分化成熟

本实验发现 OVX+OC 组中破骨细胞出现最早,个数最多,凋亡时间最晚,OVXDF+OC 组次之,SHAM+OC 组最低。表明在存在破骨细胞诱导剂的情况下,与正常大鼠 BMSCs 相比,绝经后大鼠 BMSCs 对破骨细胞分化成熟的抑制作用减弱,而经骨碎补灌胃后的绝经后大鼠 BMSCs 对破骨细胞的分化成熟的抑制作用得到加强,显示骨碎补可以通过 BMSCs 来抑制破骨细胞的分化及成熟。共培养系统中上清液以及 BMSCs 内, RANKL/RANKL/OPG: SHAM+OC 组 < OVXDF+OC 组 < OVX+OC 组; OPG: SHAM+OC 组 > OVXDF+OC 组 > OVX+OC 组,表明绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 内及其分泌的 OPG 降低,而 RANKL 升高, RANKL/OPG 比例升高,从而激活 OPG/RANKL/RANK 信号通路促进破骨细胞的分化、成熟。经骨碎补灌胃后, OPG 升高, RANKL 降低, RANKL/OPG 比例降低,抑制 OPG/RANKL/RANK 信号通路,抑制破骨细胞的分化、成熟。同时,灌胃后大鼠 BMSCs 中 Wnt10b 及 β -catenin mRNA 及蛋白含量升高,提示在此过程中骨碎补同时激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路。虽然具体作用机制尚不明确^[29],但众多研究表明 Wnt/ β -catenin 通路的激活可升高 OPG,降低 RANKL^[30-31],因此,推测骨碎补调节 BMSCs OPG 及 RANKL 可能与 Wnt/ β -catenin 通

路的激活有关。由于 OPG、RANKL 的分泌受多种机制调控,实验过程中 OPG、RANKL 的变化是否仅仅由 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活引起,是否有其他机制协同作用,尚不明确,还需一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Li CJ, Cheng P, Liang MK, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation [J]. *J clin invest*, 2015, 125(4):1509-1522.
- [2] 宋渊,李盛华,何志军.骨碎补含药血清对成骨细胞增殖、成骨的影响[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(2):125-128,170.
- [3] 薛海鹏,刘国岩,吴燕,等.骨碎补促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化[J].中国矫形外科杂志,2018,26(11):1035-1040.
- [4] 李风波,孙晓雷,马剑雄,等.柚皮苷对破骨细胞分化的影响[J].中国中药杂志,2015,40(2):308-312.
- [5] 李明,吕厚辰,尹鹏滨,等.两种卵巢切除术式建立大鼠骨质疏松模型的优势比较[J].解放军医学院学报,2015(04):383-387.
- [6] Simon D, Derer A, Andes FT, et al. Galectin-3 as a novel regulator of osteoblast-osteoclast interaction and bone homeostasis [J]. *Bone*, 2017, 105:35-41.
- [7] 徐丽丽,胥方元,万永鲜.人 bmscs 自噬水平和成骨分化能力比较[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1446-1450,1463.
- [8] 任磊,代光明,林泉,等.骨细胞 wnt/ β -catenin 通过 notch 信号促进 bmscs 成骨分化[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(5):600-605.
- [9] 张丽媛,纳青青,吴天秀,等.Orexin-1 受体抑制剂通过 wnt 通路促进骨髓间充质干细胞的成骨分化[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(5):606-611.
- [10] Wang L, Wang L, Cong X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: Safety and efficacy [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(24):3192-3202.
- [11] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannysyan H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 33132-33140.
- [12] Cai T, Sun D, Duan Y, et al. WNT/ β -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression [J]. *Exper Cell Res*, 2016, 345(2):206-217.
- [13] Ardeshirylajimi A, Golchin A, Khojasteh A, et al. Increased osteogenic differentiation potential of MSCs cultured on nanofibrous structure through activation of Wnt/ β -catenin signalling by inorganic polyphosphate [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 29:1-7.
- [14] Takano T, Li YJ, Kukita A, et al. Mesenchymal stem cells markedly suppress inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(3):286-296.
- [15] Varin A, Pontikoglou C, Labat E, et al. CD200R/CD200 inhibits osteoclastogenesis: new mechanism of osteoclast control by mesenchymal stem cells in human [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e72831.
- [16] Ma L, Aijima R, Hoshino Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates secondary osteoporosis through interleukin-17-impaired functions of recipient bone marrow mesenchymal stem cells in MRL/lpr mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6:104.
- [17] Galli C, Fu Q, Wang W, et al. Commitment to the osteoblast lineage is not required for RANKL gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(19):12654-12662.
- [18] Galli C, Fu Q, Wang W, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(6):1658-1667.
- [19] 张峻玮,李朝辉,陈玲玲,等.基于数据挖掘的中医药治疗原发性骨质疏松症用药规律分析[J].河北中医,2018,40(6):933-937.
- [20] 李晋玉,赵学丁,孙旗,等.骨碎补总黄酮的实验及临床研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(10):1357-1364.
- [21] 刘剑刚,谢雁鸣,徐哲,等.骨碎补总黄酮的活血化瘀作用及对实验性微循环障碍和骨质疏松症的影响[J].中国骨质疏松杂志,2006,12(1):46-49.
- [22] Guo D, Wang J, Wang X, et al. Double directional adjusting estrogenic effect of naringin from *Rhizoma drynariae* (Gusuibu) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(2):451-457.
- [23] 尹文哲,张小玲,叶义杰,等.骨碎补对微重力下共培养骨髓中成骨细胞分化的影响[J].中医药学报,2017,45(4):16-20.
- [24] 李洋,康倩,荣婵,等.骨碎补总黄酮对 MLO-Y4 细胞增殖、分化、矿化和凋亡影响的探究[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(5):592-598.
- [25] 陈云刚,谭国庆,任维龙,等.骨碎补含药血清经 wnt/ β -catenin 信号通路对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].中国药理学通报,2017,33(6):830-836.
- [26] 高俊,胡继红,张曦.骨碎补总黄酮对废用性骨质疏松大鼠 BMSCs 成脂分化的影响及机制探讨[J].山东医药,2015,55(35):28-30.
- [27] 刘康,吴风晴,吴连国,等.骨碎补总黄酮对骨质疏松模型大鼠 OPG/RANKL/RANK 轴系统的影响[J].中国现代应用药学,2015,32(6):652-656.
- [28] 刘钟,郭梁,吴业东,等.骨碎补总黄酮作用于 opg/rankl/rank 轴系统的相关研究[J].中华中医药学刊,2010,28(2):271-274.
- [29] Kobayashi Y, Uehara S, Koide M, et al. The regulation of osteoclast differentiation by wnt signals [J]. *Bonekey Rep*, 2015, 4:713.
- [30] Zhang L, Liu W, Zhao J, et al. Mechanical stress regulates osteogenic differentiation and RANKL/OPG ratio in periodontal ligament stem cells by the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(10):2211-2219.
- [31] Glass DA, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation [J]. *Developmental Cell*, 2005, 8(5):751-764.

(收稿日期:2018-12-14;修回日期:2018-12-26)