

## · 论 著 ·

基于 *Mekk2*<sup>-/-</sup> 小鼠研究贞术调脂胶囊调控  $\beta$ -catenin 泛素化的成骨机制孙平<sup>1</sup> 李凤英<sup>2</sup> 杨国柱<sup>3</sup> 韩晓蕊<sup>4</sup> 陈镇秋<sup>5,6</sup> 何伟<sup>5,6</sup> 洪郭驹<sup>5,6,7\*</sup> 郭姣<sup>8\*</sup>

1. 广东药科大学附属第一医院内分泌科, 广东 广州 510080

2. 青岛市即墨区人民医院内分泌科, 山东 青岛 266200

3. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006

4. 华南理工大学医学院, 广东 广州 510006

5. 广州中医药大学第一附属医院关节骨科, 广东 广州 510405

6. 广州中医药大学岭南医学中心国家重点学科中医骨伤科学实验室, 广东 广州 510405

7. 加拿大阿尔伯塔大学医学院骨外科部, 加拿大 埃德蒙顿 T6G 2R3

8. 广东药科大学, 广东 广州 510006

中图分类号: R247 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 12-1726-06

**摘要:** **目的** 观察促分裂原活化蛋白激酶 2 敲除 (*Mekk2*<sup>-/-</sup>) 小鼠的表型变化以及贞术调脂胶囊 (FTZ) 含药血清对 MEKK2 表达影响, 探讨 FTZ 对 MEKK2- $\beta$ -catenin 通路以及  $\beta$ -catenin 去泛素化的作用机制。 **方法** 建立 *Mekk2*<sup>-/-</sup> 小鼠, 通过 MicroCT 检测其与野生型的表型差别; 通过 FTZ 干预 *Mekk2*<sup>-/-</sup> 小鼠和野生型的成骨细胞, 运用 Western blot 观察对  $\beta$ -catenin 磷酸化水平的作用; 通过 FTZ 与 FGF2 干预野生型小鼠原代细胞, 观察对 MEKK2 磷酸化水平的作用; 通过 C3H10T1/2 细胞转染后进行 FTZ 和 Wnt3a 干预, 观察  $\beta$ -catenin 活性变化。 **结果** *Mekk2*<sup>-/-</sup> 小鼠与野生型小鼠相比, BV/TV、Tb.N、Tb.Th 值均较后者降低 ( $P < 0.05$ ), Tb.sp 无差异变化 ( $P > 0.05$ )。 FTZ 含药血清增强了野生型小鼠细胞  $\beta$ -catenin 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ ), 但是在 *Mekk2*<sup>-/-</sup> 小鼠细胞中则明显降低 ( $P < 0.05$ )。 FTZ 含药血清和 FGF2 干预后的原代细胞中, p-MEKK2/3 表达水平均比不干预时细胞增强 ( $P < 0.05$ ), 且二者提高水平不存在明显差异 ( $P > 0.05$ )。 FTZ 含药血清和 Wnt3a 均促进  $\beta$ -catenin 活化, 而 FTZ 含药血清和 Wnt3a 共同干预细胞后, 可见  $\beta$ -catenin 活化程度更高, 效果呈累加效应 ( $P < 0.05$ )。 **结论** FTZ 通过激活 MEKK2 通路, 独立于 Wnt 经典通路促进  $\beta$ -catenin 的去泛素化进程。

**关键词:** 中医中药; 复方贞术调脂胶囊; 促分裂原活化蛋白激酶激酶 2;  $\beta$ -catenin 泛素化; 敲除小鼠

Research on the osteogenesis of  $\beta$ -catenin ubiquitination by FTZ in *Mekk2*<sup>-/-</sup> miceSUN Ping<sup>1</sup>, LI Fengying<sup>2</sup>, YANG Guozhu<sup>3</sup>, HAN Xiaorui<sup>4</sup>, CHEN Zhenqiu<sup>5,6</sup>, HE Wei<sup>5,6</sup>, HONG Guojun<sup>5,6,7\*</sup>, GUO Jiao<sup>8\*</sup>

1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

2. Department of Endocrinology, Qingdao Jimo People's Hospital, Qingdao 266200, China

3. School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

4. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

5. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

6. Lab of Orthopedics and Traumatology of Chinese Medicine of Linnan Medical Research Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

7. Division of Orthopedics, Faculty of Medicine and Dentists, the University of Alberta, Edmonton T6G 2R3, Canada

8. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

\* Corresponding authors: HONG Guojun, Email: gdsthgj@foxmail.com; GUO Jiao, Email: gyguoyz@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目青年科学基金(81603641)

\* 通信作者: 洪郭驹, Email: gdsthgj@foxmail.com; 郭姣, Email: gyguoyz@163.com

**Abstract: Objective** To observe the phenotypic changes of mitogen-activated protein kinase 2 knockout (*Mekk2*<sup>-/-</sup>) mice and the effect of FTZ containing serum on the expression of MEKK2; To investigate the mechanism of FTZ on the MEKK2- $\beta$ -catenin pathway and the deubiquitination of  $\beta$ -catenin. **Methods** *Mekk2*<sup>-/-</sup> mice were established by CRISPR/Cas9. The phenotypic differences between *Mekk2*<sup>-/-</sup> mouse and wildtype mouse were detected by MicroCT. The osteoblasts of *Mekk2*<sup>-/-</sup> mouse and wild-type mouse are treated by FTZ and the phosphorylation of  $\beta$ -catenin was detected by Western blot. The phosphorylation level of MEKK2 was observed in osteoblasts wildtype mouse treated by FTZ and FGF2;  $\beta$ -catenin activity was evaluated in transfection of C3H10T1/2 cells treated by FTZ and Wnt3a. **Results** The BV/TV, Tb.N, and Tb.Th values of *Mekk2*<sup>-/-</sup> mice were lower than those of the wildtype mouse ( $P < 0.05$ ), and there was no difference in Tb.sp ( $P > 0.05$ ). FTZ containing serum enhanced the phosphorylation of  $\beta$ -catenin in osteoblasts of wild type mice ( $P < 0.05$ ), but significantly decreased in *Mekk2*<sup>-/-</sup> mouse ( $P < 0.05$ ). In the primary osteoblasts after FTZ containing serum and FGF2 treatments, the expression of p-MEKK2/3 was higher than that of non-treatment group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between the two levels ( $P > 0.05$ ). Both FTZ containing serum and Wnt3a promoted the activation of  $\beta$ -catenin activation. After FTZ-containing serum and Wnt3a treatment in the cells, the activation of  $\beta$ -catenin was higher and the co-treatment effect was additive ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** FTZ promotes the deubiquitination of  $\beta$ -catenin by activating the MEKK2 pathway, independent of the Wnt classical pathway.

**Key words:** traditional Chinese medicine; FTZ; MEKK2;  $\beta$ -catenin ubiquitination; knockout mice

糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是由于长期使用糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 所导致的骨代谢紊乱, 主要表现为血清游离脂肪酸含量增高、骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加和易于骨折<sup>[1-2]</sup>。在 10 个国家进行的全球骨质疏松症妇女纵向研究<sup>[3-4]</sup>中, 有 4.6% 的绝经后骨质疏松症患者正在服用 GC。在 GIOP 的研究当中, GC 介导  $\beta$ -catenin 是调控骨代谢、促进骨形成的关键节点。而在近期的研究<sup>[5]</sup>中发现, 除了经典的 Wnt 信号通路外, 还存在促分裂原活化蛋白激酶激酶 2 (mitogen-activated protein kinase kinase 2, MEKK2) 的调控通路, 有效地抑制  $\beta$ -catenin 泛素化, 维持  $\beta$ -catenin 的稳定。

在前期研究中, 笔者团队发现以贞术调脂胶囊 (FTZ) 为代表的“补肾祛湿”法对治疗 GIOP 有着优良的治疗效果, 对于抑制骨丢失、保存在体骨量有明显的效果<sup>[6-8]</sup>。更重要的是, 笔者团队初步发现了 FTZ 对 GIOP 中的 MEKK2-Wnt 偶联存在调控作用, 从而拮抗 GC 副作用, 改善骨微环境的骨脂代谢功能, 促进成骨分化和抑制骨丢失<sup>[9]</sup>。鉴于此, 本研究进一步通过 CRISPR/Cas9 技术建立 *Mekk2* 敲除 C57BL/6 J 小鼠, 并提取小鼠原代成骨细胞, 添加 FTZ 含药血清进行干预, 经与野生型小鼠成骨细胞比较, 更深层地挖掘 FTZ 拮抗 GC 抗 GIOP 的内在分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 *Mekk2* 小鼠敲除方法与鉴定: 采用 CRISPR/

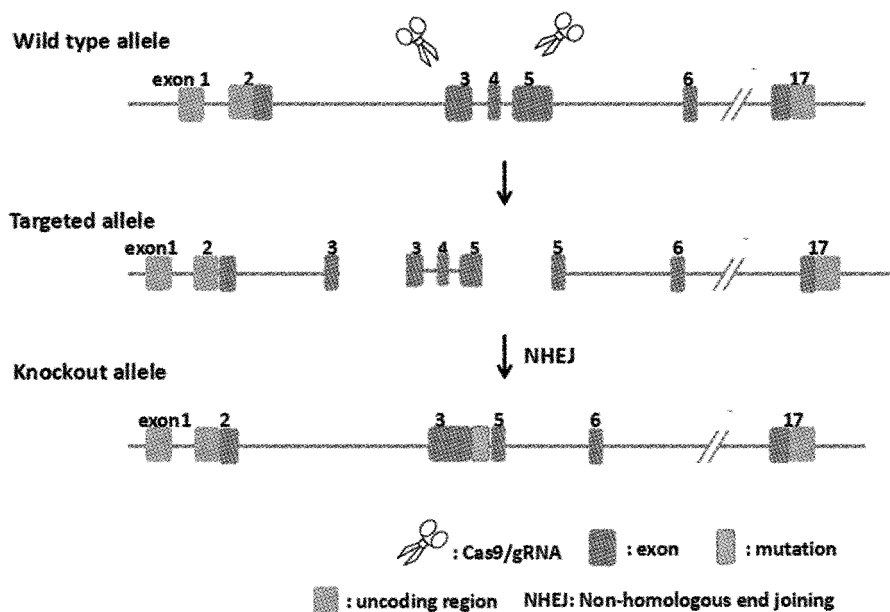
Cas9 技术, 利用非同源重组修复引入突变的方式, 造成 *Mekk2* 基因蛋白读码框移码, 功能缺失, 敲除设计策略见图 1。具体操作如下: 通过体外转录的方式, 获得 Cas9 mRNA 和 gRNA。将 Cas9 mRNA 和 gRNA (Cas9 和 gRNA 体外转录信息见表 1) 显微注射到 C57BL/6 J 小鼠的受精卵中, 获得 F0 代小鼠。在获得 F0 代小鼠后, 经 PCR 产物测序确认, 共获得 8 只日的基因蛋白读码框移码的 F0 代小鼠; 选取阳性的 F0 代小鼠分别与野生型 C57BL/6 J 小鼠交配, 获得的 F1 代小鼠。鉴定方法同 F0 代小鼠鉴定。选取 F1 代刚出生乳鼠用于原代成骨细胞提取, 选取 F1 代的 6-8 周敲除小鼠用于 MicroCT 检测。

表 1 在 *Mekk2* 敲除中的 Cas9 和 gRNA 体外转录信息

Table 1 The transcription information of Cas9 and gRNA in *Mekk2* knockout

| 名称    | 序列 (5' ~ 3')             |
|-------|--------------------------|
| gRNA1 | CTGGCCGACTGGCCTTATGA AGG |
| gRNA2 | TAAAGATAATGCTGGCCGAC TGG |
| gRNA3 | TCTAAGTCTAAGATCGCCTT TGG |
| gRNA4 | TAACTGGTCTAGTAACCTGCA GG |

**1.1.2 野生型乳鼠来源及培育条件:** 用于受精培育、MicroCT 及含药血清制备的小鼠为 C57BL/6, 雌雄均有, SPF 级, 6~8 周龄, 小鼠体重 18~20 g; 用于原代成骨细胞提取的乳鼠为 C57BL/6 品系的 5 d 大乳鼠。由广州中医药大学动物实验中心 [SCXK (粤)2013-0001] 标准饲养, 实验过程中对动物的处置符合中国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。培育条件室温控制在 23℃~25℃, 相对湿度 50%~60%, 光照时间 07:00~19:00, 自由饮水及进食。

图 1 *Mekk2* 敲除策略示意图Fig.1 Schematic diagram of *Mekk2* knockout strategy

## 1.2 方法

**1.2.1** MicroCT 检测小鼠骨组织表型:将 6~8 周野生型小鼠和 *Mekk2*<sup>-/-</sup> 小鼠处死后取右侧胫骨,置于 Micro-CT 平台上,从胫骨近端扫描至远端,得出整个胫骨的 3D 重建层面图片。通过 Micro-CT 自带计算机分析系统根据所创建图片的有效信息,依次计算骨表面积与骨骼体积比 (BS/BV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数目 (Tb.N)、骨小梁间隙 (Tb.Sp)。

**1.2.2** FTZ 含药血清制备:小鼠 (共 10 只) 先适应性饲养 7 d,给药前将小鼠禁食 6 h。将复方贞术调脂胶囊 (购自广东药科大学附属第一医院) 剖开,参照人用量及所规定的人与鼠体表面积关系得出小鼠所需的等效剂量,以 5 倍等效剂量对小鼠进行药物灌胃,2 次/d,连续 7 d。末次灌胃 1 h 后,行浅麻醉,心脏取血 1~2 mL。室温静置 30 min 后取上清液,3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,取上清液,冰冻保存备用。每次使用 10 % 含药血清 (1 mL 培养液中添加 0.1 mL 含药血清) 作为添加量。

**1.2.3** 成骨细胞培养和分化测定:通过胶原酶 II 消化从 5 d 的新生乳鼠头盖骨中分离出细胞。将细胞在含有抗坏血酸和  $\beta$ -甘油磷酸的培养基中培养,以分化成原代成骨细胞。将原代成骨细胞培养于含有 10 % FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 % 青霉素/链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基中。

**1.2.4** 免疫沉淀 (PI) 实验:用裂解液裂解成骨细

胞,测定蛋白浓度,向蛋白上清液中加入 1.0  $\mu$ g IgG 和 80  $\mu$ L protein A/G 珠子孵育,离心后取上清,加入 10  $\mu$ L 抗体沉淀 p-MEKK2/3 和 MEKK2 并孵育过夜,再加入 80  $\mu$ L A/G-珠子孵育,收集免疫沉淀物,加入缓冲液,剩余步骤同 1.2.5。

**1.2.5** Western blot 实验:将细胞裂解液与缓冲液混匀形成样品,吸取样品与预染蛋白 marker 注入电泳,350 mA 转膜 3 h。随后 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。加入一抗 ( $\beta$ -catenin 及 p- $\beta$ -catenin,均按照厂家说明稀释, Sigma 公司,美国)。经孵育过夜后, TBST 洗涤并加入相应二抗。最后在凝胶成像系统中进行曝光和成像分析。

**1.2.6** Luciferase 报告实验:将 0.5  $\mu$ g 的 TOPflash 质粒和 50 ng 海肾荧光素酶质粒瞬时转染在 12 孔板上生长的 C3H10T1/2 细胞 (Thermo Fisher Scientific 公司,美国)。转染 24 h 后按空白对照组、FTZ 含药血清、Wnt3 蛋白 (Sigma 公司,美国) 以及 FTZ 含药血清和 Wnt3 共同干预,继续培养 48 h,随后裂解细胞,并使用双重荧光素酶报告基因测定系统获得标准化的荧光素酶活性。

## 1.3 统计学处理

计量资料以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示,所有统计分析均使用 SPSS 22.0 统计软件处理。组间均数比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Mekk2*<sup>+/-</sup>小鼠构建与鉴定

经受精卵显微注射,本研究共获得 38 只 F0 代小鼠。通过 PCR 的方式,对 F0 代小鼠的基因型进行鉴定,共获得 8 只目的基因蛋白读码框移码的阳性 F0 代小鼠;F0 代小鼠 PCR 产物,经测序,阳性 F0 代阳性小鼠(1 号和 16 号)分别与野生型 C57BL/6 J 小鼠交配,最终获得 6 只 F1 代杂合子小鼠(*Mekk2*<sup>+/-</sup>)。

### 2.2 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠培育

将获得的 *Mekk2*<sup>+/-</sup>小鼠(*Mekk2*<sup>+/-</sup>)分成两部分:一部分杂合子小鼠与野生型小鼠交配,扩群繁育较多的 *Mekk2*<sup>+/-</sup>小鼠;一部分杂合子小鼠自交,获得基因敲除纯合子小鼠(*Mekk2*<sup>-/-</sup>),本实验最后共获得 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠 20 只用于原代细胞提取。

### 2.3 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠表型差异

采用 MicroCT 对 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠进行骨组织的表型检测。结果提示,*Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠相比,前者 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 值降低

( $P=0.014$ ,  $P=0.035$ ,  $P=0.028$ ),Tb.sp 无差异变化( $P=0.084$ )。见表 2。

表 2 MicroCT 检测 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠骨组织

Table 2 MicroCT detects the bone tissue of *Mekk2*<sup>-/-</sup> mice and wild type mice

| 组别                          | BT/TV/%      | Tb.Th/mm      | Tb.Sp/mm   | Tb.N/mm      |
|-----------------------------|--------------|---------------|------------|--------------|
| 野生型小鼠                       | 14.12±0.451  | 0.091±0.012   | 0.41±0.011 | 3.11±0.110   |
| <i>Mekk2</i> <sup>-/-</sup> | 8.44±0.310 * | 0.051±0.004 * | 0.39±0.012 | 1.56±0.134 * |

注: \* $P<0.05$ 。

### 2.3 FTZ 含药血清激活 MEKK2 以稳定成骨细胞中的 $\beta$ -catenin

分别加入 FTZ 含药血清以刺激野生型小鼠成骨细胞和 *Mekk2*<sup>-/-</sup>成骨细胞,干预时间为 10、20、40 min,并通过 Western blot 分析  $\beta$ -catenin(S675)的磷酸化水平。结果提示,FTZ 含药血清在 40 min 时可增强野生型小鼠细胞  $\beta$ -catenin(S675)的磷酸化水平( $P=0.026$ ),但是在 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠细胞中则明显降低,特别是在 40 min 时( $P=0.032$ )。见图 2。

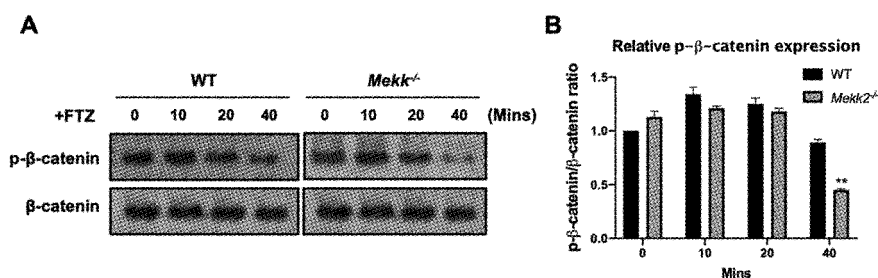


图 2 FTZ 含药血清促进  $\beta$ -catenin 磷酸化水平

A: FTZ 含药血清添加到野生型(WT)小鼠和 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠的成骨细胞,干预时间在 0、10、20、40 min 不等,Western blot 检测 p- $\beta$ -catenin 表达水平;B: p- $\beta$ -catenin 与  $\beta$ -catenin 表达水平比率。

Fig.2 FTZ containing serum promotes phosphorylation of  $\beta$ -catenin

A: FTZ containing serum is added into the primary osteoblast of wild type mice and *Mekk2*<sup>-/-</sup> mice at 0, 10, 20, 40 mins. Western blot is used to detect the expression of p- $\beta$ -catenin; B: the ratio of p- $\beta$ -catenin and  $\beta$ -catenin.

### 2.4 FTZ 含药血清诱导 MEKK2 磷酸化

在野生型小鼠原代细胞中,采用 FTZ 含药血清和 FGF2(诱导 MEKK2 的激活因子)对细胞进行干预。结果发现,FTZ 含药血清和 FGF2 干预后的原代细胞中,p-MEKK2/3 表达水平平均比不干预时细胞增强( $P=0.003$ ,  $P=0.008$ ),且二者提高水平不存在明显差异( $P=0.062$ ,  $P=0.071$ )。见图 3。

### 2.5 FTZ 含药血清促进 $\beta$ -catenin 活化

将 TOPflash 质粒和海肾荧光素酶质粒瞬时转染入 C3H10T1/2 细胞中。用 FTZ 含药血清或

Wnt3a 以及二者共同干预细胞。结果提示,FTZ 含药血清和 Wnt3a 均促进  $\beta$ -catenin 活化,而 FTZ 含药血清和 Wnt3a 共同干预细胞后,可见  $\beta$ -catenin 活化程度更高,效果呈累加效应( $P<0.05$ )。见图 4。

## 3 结论

GIOP 的发生和发展密切关系着骨吸收破坏的平衡稳定或者失衡,通过药物寻求再平衡至关重要[10]。从细胞层面上看,GC 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 经典通路,加速  $\beta$ -catenin 磷酸化降解,从而激活泛素

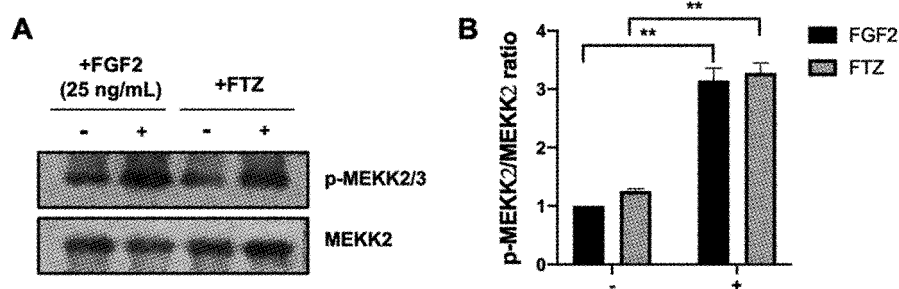


图3 FTZ 含药血清诱导 MEKK2 磷酸化

A: FGF2 (25 ng/mL) 与 FTZ 含药血清共同干预野生型小鼠原代成骨细胞,并用免疫沉淀技术检测 p-MEKK2/3 和 MEKK2 表达;  
B: p-MEKK2/3 和 MEKK2 表达水平比率。

Fig.3 FTZ containing serum induces phosphorylation of MEKK2

A: FGF2 (25 ng/mL) and FTZ containing serum are added into the primary osteoblast of wild type mice. Immunoprecipitation is used to detect the expression of p-MEKK2/3; B: the ratio of p-MEKK2/3 and MEKK2.

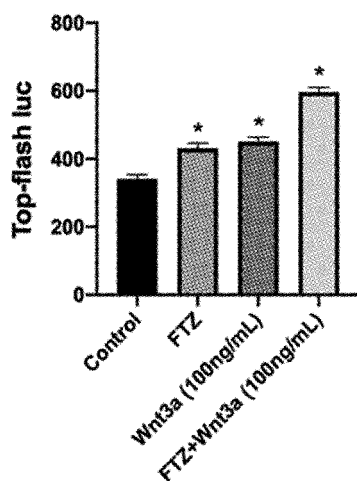


图4 FTZ 含药血清和 Wnt3a 促进  $\beta$ -catenin 活化

Fig. 4 FTZ containing serum and Wnt3a promote  $\beta$ -catenin activation

系统,是造成 GIOP 的重要环节和基础分子机制。当 GC 超量时,抑制  $\beta$ -catenin 泛素系统的上游机制被阻断,可抑制 Wnt 下游因子<sup>[11-12]</sup>,激活 Wnt 抑制因子<sup>[12-17]</sup>,更可以抑制 Wnt 自身表达<sup>[18]</sup>。而最新的研究发现,MEKK/SET11 亚家族成员 MEKK2 可有效地抑制  $\beta$ -catenin 的泛素化。研究<sup>[5]</sup>指出,由 FGF2 所激活 MEKK2 可以通过 USP15 的募集,从有别于 Wnt 经典通路之外,实现抑制  $\beta$ -catenin 泛素化的效果,从而阻止其组成蛋白酶产生周转。这一种创新性发现,提出了 MEKK2 的正向调控对实现细胞内  $\beta$ -catenin 的稳定性具有开拓性意义。基于此,笔者团队认为,如果能寻找到正向介入 MEKK2 通路的效用药物,即可以发挥与 Wnt 经典通路同样的预期效果。

在既往的研究当中发现,FTZ 中药方剂的效用机制契合 GIOP 骨脂代谢分子机制,在生物表型上能够系统解决骨组织内脂肪沉积,成骨活性减弱,骨代谢紊乱等<sup>[6-8]</sup>。这也是 FTZ 作为降脂类中成药在骨科领域的发展。笔者团队经研究进而发现,在 GIOP 模型当中,FTZ 不仅提高了骨量,抑制了骨质疏松的进展,同时还调控骨组织内 Wnt3a、MEKK2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达,这提示 FTZ 通过 MEKK2-Wnt 偶联信号通路从而促进 GIOP 成骨功能。在细胞层面也证实了这一点,FTZ 同时促进了  $\beta$ -catenin 和 MEKK2 的蛋白表达。另外,研究<sup>[9]</sup>还发现,FTZ 可增强  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 转录活性,从而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶基因的表达。

基于上述研究基础,笔者团队更深入地通过建立 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠,经与野生型小鼠比较,观察成年小鼠的表型改变。结果显示,*Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠的成骨量比野生型小鼠减少,尽管在重建当中未见骨小梁的结构紊乱,但是 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠因缺少 *Mekk* 基因而导致骨发育的迟缓与不足是明显的,这与文献当中的结论是一致的。本研究又通过提取 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠和野生型小鼠的原代成骨细胞,研究 FTZ 对于  $\beta$ -catenin 磷酸化的作用。结果表明,FTZ 在 *Mekk2*<sup>-/-</sup>小鼠的成骨细胞中, $\beta$ -catenin 磷酸化的水平相比野生型的细胞下降,这提示 FTZ 确系通过激活 MEKK2 发挥稳定成骨细胞内  $\beta$ -catenin 水平,抑制  $\beta$ -catenin 泛素化的作用。另外,已知 FGF2 是激活 MEKK2 的重要因子,而在与 FTZ 的比较当中提示,FTZ 与 FGF2 所能促进 MEKK2 磷酸化的水平基本一致,这提示 FTZ 或直接或通过 FGF2 间接激活 MEKK2 活性。最后,通过 Luciferase 报告实验,团队发现 FTZ

与 Wnt3a 均可以促进  $\beta$ -catenin 活化,当二者结合干预,可出现  $\beta$ -catenin 活化的叠加效应,因此提示 FTZ 具有独立于 Wnt 经典通路,通过作用于 MEKK2 来发挥效应的。通过与之前研究的比较发现,FTZ 在分子层面的药理作用是整体性的,即作用于 Wnt 通路又作用于 MEKK2 通路,但是二者相互独立,又相互配合,最终起到了  $\beta$ -catenin 去泛素化的效果。

综上所述,FTZ 可以作为一个较为理想的药物,既促进 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,又通过对 MEKK2 的正向调控作用,避免了 Wnt 或其同源受体的因激活而过度冗余,消除信号传导过程中多种混杂因子参与,减少 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的消极表型<sup>[19]</sup>,从而实现治疗 GIOP 的良好作用。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Kok C, Sambrook PN. Secondary osteoporosis in patients with an osteoporotic fracture [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2009, 23(6):769-779.
- [ 2 ] Hernández JL, Olmos JM, Romaña G, et al. Bone mineral density in statin users: a population-based analysis from a Spanish cohort [J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32 (2): 184-191.
- [ 3 ] Díez-Pérez A, Hooven FH, Adachi JD, et al. Regional differences in treatment for osteoporosis. The global longitudinal study of osteoporosis in women (GLOW) [J]. Bone, 2011, 49 (3):493-498.
- [ 4 ] Silvermann S, Curtis J, Saag K, et al. International management of bone health in glucocorticoid-exposed individuals in the observational GLOW study [J]. Osteoporos Int, 2015, 26 (1): 419-420.
- [ 5 ] Greenblatt MB, Shin DY, Oh H, et al. MEKK2 mediates an alternative  $\beta$ -catenin pathway that promotes bone formation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(9): 1226-1235.
- [ 6 ] 孙平,邢强强,叶秋莹,等.复方贞术调脂胶囊对外培养破骨细胞骨吸收的影响[J].广东医学,2018,39(5):657-660.
- [ 7 ] 孙平,虎松艳,巫培康,等.复方贞术调脂胶囊对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠血脂和骨转换指标的研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(10):1308-1310,1314.
- [ 8 ] 孙平,蔡妹群,董群伟,等.复方贞术调脂胶囊对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠骨量和骨转换指标的研究[J].海南医学, 2016,27(1):3-6.
- [ 9 ] 洪郭驹,陈鹏,韩晓蕊,等.复方贞术调脂胶囊调控 MEKK2-Wnt 偶联拮抗  $\beta$ -catenin 泛素化改善大鼠糖皮质激素骨质疏松症[J].中国实验动物学报,2018,26(1):36-44.
- [ 10 ] 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.
- [ 11 ] Jiang Y, Gou H, Wang S, et al. Effect of pulsed electromagnetic field on bone formation and lipid metabolism of glucocorticoid-induced osteoporosis rats through canonical Wnt signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016: 4927035.
- [ 12 ] Guañabens N, Gifre L, Peris P. The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Curr Osteoporos Rep, 2014, 12 (1):90-97.
- [ 13 ] Hill TP, Spater D, Taketo MM, et al. Canonical Wnt/betacatenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes [J]. J Dev Cell, 2005, 8(5):727-738.
- [ 14 ] Zhang Y, Ma C, Liu X, et al. Epigenetic landscape in PPAR $\gamma$ 2 in the enhancement of adipogenesis of mouse osteoporotic bone marrow stromal cell [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852 (11):2504-2516.
- [ 15 ] Shi XM, Blair HC, Yang X, et al. Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPAR $\gamma$  gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation [J]. J cell Biochem, 2000, 76 (3):518-527.
- [ 16 ] Mak W, Shao X, Dunstan CR, et al. Biphasic glucocorticoid-dependent regulation of Wnt expression and its inhibitors in mature osteoblastic cells [J]. Calcif Tissue Int, 2009, 85(6): 538-545.
- [ 17 ] Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, et al. Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner [J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2): 568-579.
- [ 18 ] Yun SI, Yoon HY, Jeong SY, et al. Glucocorticoid induces apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  [J]. J Bone Miner Meta, 2009, 27(2): 140-148.
- [ 19 ] Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors [J]. Current pharmaceutical design, 2013, 19 (4):634-664.

(收稿日期:2019-10-18;修回日期:2019-12-20)