

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.03.001

• 基础研究 •

川续断提取皂甙促进骨质疏松模型中骨髓基质细胞成骨分化的作用机制研究*

许 勇^{1,2} 谢贤斐¹ 薛 彬¹ 熊焱昊¹ 江 敏²

(1 上海交通大学医学院附属瑞金医院骨伤科 上海 200025; 2 上海市伤骨科研究所骨与关节损伤重点实验室 上海 200025)

摘要 目的:探讨川续断提取皂甙(ASA)促进骨质疏松模型中骨髓基质细胞(rBMSCs)成骨分化的作用机制。**方法:**选取3月龄的雌性SD大鼠60只,随机分为卵巢切除组和假手术组,每组30只。采取卵巢切除法构建骨质疏松模型。建模成功后采用微型计算机断层扫描获得其松质骨微观结构的三维图像并进行分析。采用CCK-8法测定ASA对卵巢切除组rBMSCs增殖的影响。分析碱性磷酸酶(ALP)活性;荧光定量PCR检测成骨基因ALP、骨桥蛋白(OPN)、Runt相关转录因子2(RUNX2)的表达情况;蛋白免疫印迹试验检测磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)蛋白表达情况。**结果:**与假手术组比较,卵巢切除组骨小梁数量、骨小梁厚度和骨体积分数下降,但骨小梁分离度升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。第4天和第7天,ASA(10^{-5} mol/L)组、ASA(10^{-6} mol/L)组、ASA(10^{-7} mol/L)组和ASA(10^{-8} mol/L)组rBMSC增殖均显著高于ASA(0 mol/L)组,以ASA(10^{-5} mol/L)最为显著;而ASA(10^{-1} mol/L)组、ASA(10^{-2} mol/L)组、ASA(10^{-3} mol/L)组和ASA(10^{-4} mol/L)组rBMSC增殖显著低于ASA(0 mol/L)组,以ASA(10^{-4} mol/L)最为显著,差异均有统计学意义($P<0.05$)。第7天和第14天,ASA(10^{-5} mol/L)组、ASA(10^{-6} mol/L)组、ASA(10^{-7} mol/L)组和ASA(10^{-8} mol/L)组ALP活性均显著高于ASA(0 mol/L)组,且第14天ALP活性高于第7天,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,ASA组成骨相关基因ALP、OPN和RUNX2相对mRNA表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与ASA组比较,wortmannin组成骨相关基因ALP、OPN和RUNX2相对mRNA表达水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,ASA组PI3K、p-AKT蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与ASA组比较,wortmannin组PI3K、p-AKT蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**ASA能促进骨质疏松模型rBMSCs增殖,增强ALP活性,增强ALP、OPN和RUNX2的表达,而PI3K通路抑制剂wortmannin降低了这些成骨作用,并降低了ASA诱导的PI3K、p-AKT水平,表明ASA通过PI3K/AKT信号通路促进骨质疏松模型rBMSCs成骨分化。

关键词:川续断提取皂甙;骨质疏松;骨髓基质细胞;PI3K;AKT;成骨分化

中图分类号:R-33;R68;R243 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)03-401-06

Study on the Mechanism of Asperosaponin in Promoting Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells in Osteoporosis Model*

XU Yong^{1,2}, XIE Xian-fei¹, XUE Bin¹, XIONG Yan-hao¹, JIANG Min²

(1 Department of Orthopedics and Traumatology, Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200025, China; 2 Key Laboratory of Bone and Joint Injury, Shanghai Institute of Orthopedics and Traumatology, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of asperosaponin (ASA) in promoting osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells (rBMSCs) in osteoporosis model. **Methods:** 60 female SD rats aged 3 months were selected and randomly divided into ovariectomized group and sham operation group, with 30 rats in each group. The ovariectomy method was used to construct an osteoporosis model. After the modeling was successful, the microcomputer tomography was used to obtain the three-dimensional image of the microstructure of the cancellous bone and analyzed. The CCK-8 method was used to determine the effect of ASA on the proliferation of rBMSCs in the ovariectomized group. Analyzed the alkaline phosphatase (ALP) activity, and fluorescent quantitative PCR to detect the expression of osteogenic genes ALP, osteopontin (OPN), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2). Western blotting was used to detect the expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phosphorylated protein kinase B (p-AKT). **Results:** Compared with the sham operation group, the trabeculae number, trabecular thickness and bone volume fraction in the ovariectomized group decreased, but the trabecular separation increased, and the difference were statistically significant ($P<0.05$). On 4 d and 7 d, the proliferation of rBMSCs in the ASA (10^{-5} mol/L) group, ASA (10^{-6} mol/L) group, ASA (10^{-7} mol/L) group and ASA (10^{-8} mol/L) group were all significantly higher

* 基金项目:上海市卫计委科研项目(20134211)

作者简介:许勇(1975-),男,博士,副主任医师,研究方向:代谢性及退行性骨病,E-mail: xuyong11355@163.com

(收稿日期:2021-06-05 接受日期:2021-06-28)

than the ASA (0 mol/L) group, with ASA (10^{-5} mol/L) being the most significant; while the ASA (10^{-1} mol/L) group, ASA (10^{-2} mol/L) group, and ASA (10^{-3} mol/L) group and the ASA (10^{-4} mol/L) group was significantly lower than that in the ASA (0 mol/L) group, with ASA (10^{-4} mol/L) being the most significant, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). On 7d and 14d, the ALP activity of ASA (10^{-5} mol/L) group, ASA (10^{-6} mol/L) group, ASA (10^{-7} mol/L) group and ASA (10^{-8} mol/L) group were all significantly higher than the ASA (0 mol/L) group, and the ALP activity on 14 d was higher than that on 7 d, the difference were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative mRNA expression levels of the bone-related genes ALP, OPN and RUNX2 of ASA group increased significantly, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$); compared with the ASA group, the relative mRNA expression levels of the bone-related genes ALP, OPN and RUNX2 of wortmannin group were significantly reduced, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of PI3K and p-AKT protein in the ASA group were significantly increased, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$); compared with the ASA group, the expression levels of PI3K and p-AKT protein in the wortmannin group were significantly reduced, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** ASA can promote the proliferation of osteoporosis model rBMSCs, enhance the activity of ALP, and enhance the expression of ALP, OPN and RUNX2. The PI3K pathway inhibitor wortmannin reduce these osteogenic effects and reduce the levels of PI3K and p-AKT induced by ASA. ASA promotes osteogenic differentiation of osteoporosis model rBMSCs through PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Asperosaponin; Osteoporosis; Rat bone marrow stromal cells; PI3K; AKT; Osteogenic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R68; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)03-401-06

前言

骨质疏松是以骨量减少、骨质微观结构破坏、骨脆性增加、易骨折为特征的全身性骨病,分为原发性和继发性两大类,与年龄增长密切相关^[1-3]。骨髓基质细胞(rBMSCs)产生成骨细胞,成骨细胞可以形成新的骨组织,在老年人群中,rBMSCs的成骨分化减少,导致骨形成明显减少^[4-6]。因此 rBMSCs 成骨分化能力下降可能是老年性骨质疏松发生的病因,促进 rBMSCs 的增殖和成骨分化是制定骨质疏松治疗策略的关键。马丹^[7]的研究显示,川续断提取皂甙(ASA)能显著促进人牙周膜干细胞的增殖和成骨分化,G 蛋白耦联受体 30(GPR30)和 Hippo/ 转录共激活因子 PDZ 结合基序(TAZ)信号通路参与了 ASA 促进人牙周膜干细胞的成骨分化,GPR30 介导了 Hippo/TAZ 信息通路在 ASA 促进人牙周膜干细胞成骨分化过程中的作用。Niu Y 等^[8]发现 ASA 对 MC3T3-E1 细胞和原代成骨细胞具有显著的增殖、分化和矿化作用,诱导成骨细胞分化与骨形态发生蛋白 2(BMP-2)的增加,并可能通过增加 p38 和 ERK1/2 的活性来诱导分化;表明 ASA 可诱导成骨细胞成熟分化,通过增加 BMP-2 合成,激活 p38 和 ERK1/2 来促进骨形成。磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路在 rBMSCs 的存活、增殖、迁移和分化中发挥调控作用,体内和体外研究均表明 PI3K/AKT 信号通路参与了骨质疏松的抑制^[9,10]。因此,本研究探讨 ASA 促进骨质疏松模型中骨髓基质细胞成骨分化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

川续断提取皂甙(ASA)购于南京世洲生物科技有限公司,纯度>98%,溶解在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,密封后在-20℃避光保存。大鼠购于瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司。杜尔贝科改良老鹰培养基(DMEM)和胎牛血清(FBS)购自北京诺

博莱德科技有限公司。CCK-8 试剂盒购于上海经科化学科技有限公司。二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒购于上海炎熙生物科技有限公司。碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒购于上海博湖生物科技有限公司。wortmannin(一种能够阻断 PI3K 信号传导通路的蛋白激酶抑制剂)购于碧云天生物工程研究所(中国上海)。抗坏血酸磷酸盐、 β -甘油磷酸盐、地塞米松购自北京诺博莱德科技有限公司。

1.2 实验动物和建模

3 月龄的雌性 SD 大鼠 60 只,体重 240-260 g,平均(251.0 ± 3.5)g。60 只大鼠随机分为卵巢切除组和假手术组,每组 30 只。采取卵巢切除法构建骨质疏松模型^[11]。腹腔注射每公斤体重 300 mg 水合氯醛后,对大鼠进行卵巢切除即可获得卵巢切除组;而假手术组不切除卵巢,以卵巢周围部分脂肪代替,其他手术操作相同即可获得假手术组。然后将所有大鼠置于室温 23℃、湿度 55%的笼子中喂养,光照/黑暗周期为 12 h。

1.3 微型计算机断层扫描

所有大鼠喂养 12 周后,取 10 只大鼠股骨(每组 5 只),用微型计算机断层扫描获得其松质骨微观结构的三维图像并进行分析。样本参数包括骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度和骨体积分。

1.4 细胞培养

过量水合氯醛处死 40 只大鼠,每组 20 只,获得骨髓基质细胞(rBMSCs)进行培养。摘除大鼠胫骨和股骨,并在无菌条件下小心地摘除所有附着的组织。用含 10% FBS 的 DMEM 注射液、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL 提取骨髓。将细胞置于直径 60 mm 的板上,在 37℃、5%CO₂的潮湿环境中培养 24 h,然后第一次更换培养基。在 85%的浓度下,将细胞胰蛋白酶化(0.25%胰蛋白酶),并按 1:3 的比例传代到烧瓶中。所有实验均采用第三代 rBMSCs。除细胞增殖实验外,其余所有后续实验中,在培养基添加 10 mM β -甘油磷酸盐、50 μ g/mL 抗坏血酸和 10^{-8} mol/L 地塞米松的成骨培养基取代。

1.5 细胞增殖实验

卵巢切除组 rBMSCs 以 2×10^3 个细胞 / 孔的密度接种于 96 孔板, 含不同浓度的 DMEM 和 ASA(0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L), 每个浓度有 6 个重复孔。分别在第 1 天、第 4 天、第 7 天加入 $10 \mu\text{L}$ / 孔的 CCK-8 溶液。然后将细胞置于 37°C 的黑暗环境中培养 1 h。摇动 10s 后, 测定 450 nm 处的吸光度。

1.6 ALP 活性检测

卵巢切除组 rBMSCs 与不同浓度的 ASA(0 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L) 一起接种于 24 孔板(5×10^3 个细胞 / 孔), 每个浓度设 3 个重复孔。成骨诱导 7 或 14 天后, 用 0.2% 聚乙二醇辛基苯基醚冰裂解细胞, 4°C 14000 rpm 离心 15 min。收集上清, 用 ALP 活性试剂盒测定 ALP 活性。ALP 活性比值为不同浓度 ASA 所得 ALP 活性与 ASA(0 mol/L) 组 ALP 活性的比值。

1.7 荧光定量 PCR 检测

荧光定量 PCR 检测成骨分化相关标志基因[ALP、骨桥蛋白(OPN)、Runx 相关转录因子 2 (RUNX2)]的表达水平。卵巢切除组 rBMSCs 接种于 6 孔板(4×10^4 个细胞 / 孔)中, 培养于含 ASA(10^{-5} mol/L) 和 / 或 wortmannin ($50 \mu\text{M}$) 的成骨培养基中, 每个浓度有 3 个重复孔。成骨诱导 48 h 后, 按照试剂盒说明, 用 Trizol 试剂提取总 RNA。在样品中加入脱氧核糖核酸酶 I 以消除任何 DNA 污染。然后将 RNA 样本用 cDNA 反转录试剂盒对 ALP、OPN 和 RUNX2 合成 cDNA, 并将数据归一化至

GAPDH。

1.8 蛋白免疫印迹试验

获得的卵巢切除组 rBMSCs 在成骨诱导条件下培养 2 天。然后用 PBS 洗涤 3 次, 用 RIPA 缓冲液在冰上裂解, $12000 \times g$ 离心 5 min。收集上清液, 用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度; 每个样品 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质煮沸 5 min, 然后 SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜。用 5% BSA 在 TBST 缓冲液中堵塞细胞膜, 随后与抗 PI3K 和 p-AKT 一抗在 4°C 下孵育过夜。然后在 TBST 中洗涤 3 次, 15 min, 与二抗(1:3000)在室温下孵育 30 min。使用增强化学发光可视化后, 测定了实验波段吸收值相对于 β -actin 的吸收值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件。所有实验至少重复三次, 多组间比较采用单因素方差分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示及 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微型计算机断层扫描评估

微型计算机断层扫描三维图像显示, 与假手术组比较, 卵巢切除组股骨微观结构损伤严重, 骨小梁稀疏。与假手术组比较, 卵巢切除组骨小梁数量、骨小梁厚度和骨体积分数下降, 但骨小梁分离度升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 微型计算机断层扫描松质骨微观结构参数

Table 1 Microstructure parameters of cancellous bone by microcomputer tomography

Groups	Trabeculae number(1/mm)	Trabecular thickness(mm)	Trabecular separation(mm)	Bone volume fraction(%)
Sham operation group	4.36 ± 0.17	0.33 ± 0.01	0.28 ± 0.02	37.2 ± 3.1
Ovariectomized group	3.52 ± 0.11	0.24 ± 0.02	0.36 ± 0.02	14.1 ± 2.0
T value	10.634	8.947	9.614	57.016
P value	0.005	0.010	0.008	0.000

2.2 rBMSC 增殖情况

第 1 天观察不同浓度 ASA 对卵巢切除组 rBMSC 增殖的影响, 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 提示第 1 天 ASA 对 rBMSC 增殖无影响。在第 4 天和第 7 天, ASA (10^{-5} mol/L) 组、ASA(10^{-6} mol/L) 组、ASA(10^{-7} mol/L) 组和 ASA(10^{-8} mol/L) 组 rBMSC 增殖均显著高于 ASA (0 mol/L) 组; 而 ASA(10^{-1} mol/L) 组、ASA(10^{-2} mol/L) 组、ASA(10^{-3} mol/L) 组和 ASA(10^{-4} mol/L) 组 rBMSC 增殖显著低于 ASA(0 mol/L) 组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。提示 ASA(10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L) 以剂量依赖性方式促进卵巢切除组 rBMSC 的增殖, 以 ASA(10^{-5} mol/L) 最为显著, 而 ASA(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} mol/L) 则抑制 rBMSC 增殖, 以 ASA(10^{-4} mol/L) 最为显著, 见表 2。

2.3 ALP 活性检测

第 7 天和第 14 天, ASA(10^{-5} mol/L) 组、ASA(10^{-6} mol/L) 组、ASA(10^{-7} mol/L) 组和 ASA(10^{-8} mol/L) 组 ALP 活性均显著高于 ASA(0 mol/L) 组, 且第 14 天 ALP 活性高于第 7 天, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示不同浓度 ASA 中 ALP 的活性均增

加, 其中 ASA(10^{-5} mol/L) 组 ALP 活性增加最显著, 见表 3。表明 ASA(10^{-5} mol/L) 是刺激卵巢切除组 rBMSC 成骨分化的最佳浓度。因此, 后续实验中采用了该浓度。

2.4 成骨相关基因 mRNA 表达水平

与对照组比较, ASA 组成骨相关基因 ALP、OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 wortmannin 组成骨相关基因 ALP、OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平变化不大, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 ASA 组比较, wortmannin 组成骨相关基因 ALP、OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。表明 ASA 治疗显著提高了卵巢切除组 rBMSCs 成骨基因的表达, 而 PI3K 通路抑制剂 wortmannin 则干扰 ASA 诱导的卵巢切除组 rBMSCs 成骨基因表达。

2.5 PI3K、p-AKT 蛋白表达

与对照组比较, ASA 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 wortmannin 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平变化不大, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

与 ASA 组比较, wortmannin 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 5, 图 1。提示 ASA 治疗显著上调了 PI3K、p-AKT 的表达, 而 wortmannin 下调了 PI3K、p-AKT 的表达, 表明 ASA 通过激活 PI3K/AKT 通路刺激卵巢切除组 rBMSCs 成骨分化。

表 2 第 1 天、第 4 天、第 7 天观察 ASA 对卵巢切除组 rBMSCs 增殖的影响

Table 2 Effects of ASA on rBMSCs proliferation in ovariectomized group on 1 d, 4 d and 7 d

Groups	OD value		
	1 d	4 d	7 d
ASA(0 mol/L) group	0.75± 0.08	1.12± 0.10	1.63± 0.17
ASA(10^{-1} mol/L) group	0.66± 0.07	0.72± 0.10 [*]	0.83± 0.12 [*]
ASA(10^{-2} mol/L) group	0.71± 0.08	0.69± 0.08 [*]	0.92± 0.15 [*]
ASA(10^{-3} mol/L) group	0.68± 0.08	0.58± 0.07 [*]	0.79± 0.14 [*]
ASA(10^{-4} mol/L) group	0.54± 0.06	0.49± 0.05 [*]	0.35± 0.04 [*]
ASA(10^{-5} mol/L) group	0.76± 0.08	2.16± 0.23 [*]	2.54± 0.25 [*]
ASA(10^{-6} mol/L) group	0.73± 0.08	1.97± 0.15 [*]	2.44± 0.24 [*]
ASA(10^{-7} mol/L) group	0.67± 0.07	1.88± 0.14 [*]	2.36± 0.23 [*]
ASA(10^{-8} mol/L) group	0.64± 0.06	1.65± 0.13 [*]	2.18± 0.20 [*]
F value	0.967	37.261	29.641
P value	1.063	0.000	0.000

Note: Compared with ASA(0 mol/L) group, ^{*} $P < 0.05$.

表 3 第 7 天、第 14 天 ALP 活性检测

Table 3 ALP activity test on 7 d and 14 d

Groups	ALP activity ratio	
	7 d	14 d
ASA(0 mol/L) group	1.00± 0.01	1.00± 0.01
ASA(10^{-5} mol/L) group	1.82± 0.22 [*]	2.49± 0.32 ^{**}
ASA(10^{-6} mol/L) group	1.69± 0.20 [*]	2.03± 0.30 ^{**}
ASA(10^{-7} mol/L) group	1.53± 0.17 [*]	1.85± 0.24 ^{**}
ASA(10^{-8} mol/L) group	1.44± 0.15 [*]	1.73± 0.21 ^{**}
F value	24.063	43.063
P value	0.000	0.000

Note: Compared with ASA(0 mol/L) group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with the same group on 7 d, ^{*} $P < 0.05$.

表 4 成骨相关基因 mRNA 表达水平

Table 4 mRNA expression levels of osteogenesis related genes

Groups	ALP	OPN	RUNX2
Control group	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01
ASA group	2.76± 0.38 [*]	4.31± 0.62 [*]	2.78± 0.42 [*]
Wortmannin group	1.20± 0.13 [*]	2.00± 0.36 [*]	0.88± 0.08 [*]
F value	36.095	22.085	30.691
P value	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with control group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with ASA group, ^{*} $P < 0.05$.

3 讨论

骨质疏松最严重的后果是导致骨质疏松性骨折, 造成疼痛和重度伤残, 并降低预期寿命, 长期卧床者 1 年内致死率达

表 5 PI3K、p-AKT 蛋白表达

Table 5 Expression of PI3K and p-AKT proteins

Groups	PI3K	p-AKT
Control group	1.00± 0.01	0.60± 0.01
ASA group	2.35± 0.27 [*]	1.26± 0.14 [*]
wortmannin group	1.18± 0.12 [*]	0.51± 0.08 [*]
F value	9.561	6.534
P value	0.005	0.037

Note: Compared with control group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with ASA group, ^{*} $P < 0.05$.

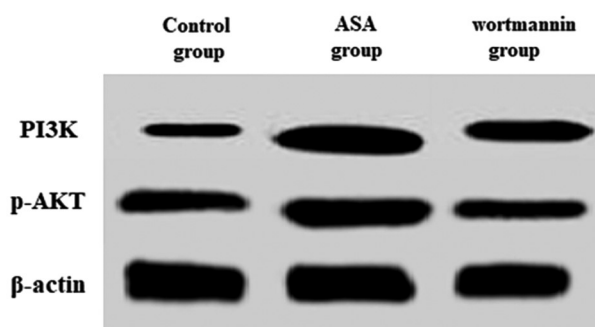


图 1 蛋白免疫印迹试验检测 PI3K、p-AKT 蛋白表达

Fig.1 Expression of PI3K and p-AKT protein was detected by Western blot

20%,永久性致残率达 50%^[12-14]。因此骨质疏松的预防和治疗受到越来越多的关注。目前治疗骨质疏松的药物主要有骨吸收抑制剂,通过抑制破骨细胞的功能来维持骨量,但这类药物在增加或恢复骨量方面的作用相对温和,迫切需要一种令人满意的合成代谢治疗方法,即增强骨形成^[15,16]。本研究旨在探讨 ASA 是否具有促进骨质疏松成骨分化的作用及其作用机制。通过对大鼠采取卵巢切除法构建骨质疏松模型,微型计算机断层扫描结果显示卵巢切除组股骨微观结构损伤严重,骨小梁稀疏,同时骨小梁数量、骨小梁厚度和骨体积分数下降,但骨小梁分离度升高,提示骨质疏松模型建模成功。

续断属续断科,是一种多年生草本植物,生长在潮湿的田野和山区,在我国长期被用作抗骨质疏松、滋补和抗衰老的药物,用于治疗腰痛、外伤性血肿,先兆流产和骨折^[17,18]。续断提取物可预防模拟微重力和卵巢切除所致的大鼠骨丢失^[19]。此外,续断总皂苷通过骨形态发生蛋白-2/丝裂原活化蛋白激酶/SMAD1/5/8 依赖性 RUNX2 信号通路诱导成骨细胞分化^[20]。ASA 是从续断中分离出来的主要活性成分,又称为木通皂苷 D,体外研究表明 ASA 能促进骨生成和骨形成,具有抗骨质疏松的作用^[21]。Liu K 等^[22]证实 ASA 通过抑制核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)诱导的破骨细胞分化和功能,在体内外发挥其抗破骨活性,表明 ASA 在预防或抑制 RANKL 介导的骨溶解性疾病方面具有潜在的治疗作用。Fang Y^[23]等研究发现,中药黄芪的提取物毛蕊异黄酮在成骨作用部分涉及 IGF1R/PI3K/AKT 信号通路,在 10^{-8} - 10^{-6} mol/L 范围内对细胞增殖、ALP 活性有剂量依赖性的增强作用,而在 10^{-5} mol/L 范围内有抑制作用;在最佳浓度时,可以增加成骨基因的 mRNA 水平、IGF1R 和 AKT 的磷酸化。本研究结果显示 ASA(10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L)以剂量依赖性方式促进卵巢切除组 rBMSC

的增殖,以 10^{-5} mol/L 最显著,而 ASA (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} mol/L)则抑制 rBMSC 增殖,以 10^{-4} mol/L 最显著;且在不同浓度 ASA 中 ALP 的活性均增加,其中 ASA(10^{-5} mol/L)组 ALP 活性增加最显著,表明 ASA(10^{-5} mol/L)是刺激骨质疏松模型 rBMSC 成骨分化的最佳浓度。

Li C 等^[24]证实 ASA 可能通过激活 PI3K/AKT 和 CREB 通路对缺氧诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用。Zhao Y 等^[25]研究表明青盐方 70%乙醇提取物对绝经后骨质疏松症有一定的抗骨丢失作用,具有潜在的治疗作用,其分子机制与成骨细胞中雌激素受体(ER)依赖性丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/ERK 和 PI3K/Akt 信号通路的激活、破骨细胞中 ER 依赖性 p-ERK 和 ER 非依赖性 p-Akt 蛋白表达的下调有关。上述研究表明 PI3K/AKT 信号通路在细胞的增殖、迁移和分化等具有重要调控作用,而 ASA 可能通过此信号通路发挥其调控 rBMSCs 成骨分化的作用。本研究证实 PI3K 通路抑制剂 wortmannin 干扰 ASA 诱导的卵巢切除组 rBMSCs 成骨分化;ASA 治疗显著提高了卵巢切除组 rBMSCs 成骨基因的表达,而 PI3K 通路抑制剂 wortmannin 则干扰 ASA 诱导的卵巢切除组 rBMSCs 成骨基因表达;ASA 治疗显著上调了 PI3K、p-AKT 的表达,而 wortmannin 下调了 PI3K、p-AKT 的表达,表明 ASA 通过激活 PI3K/AKT 通路刺激骨质疏松模型 rBMSCs 成骨分化。PI3K/AKT 作为重要的信号通路,调控细胞的生存、增殖、分化等多个病理生理过程^[26,27]。PI3K 通路在细胞增殖、分化、粘附和凋亡中起主要作用,最近的研究表明 PI3K/AKT 信号通路与骨组织代谢密切相关,通过抑制 P2X7/PI3K/AKT 信号通路,增加骨保护素(OPG)/RANKL 比值,导致骨质疏松^[28]。在成骨细胞中,PI3K/AKT 通路的激活已被证明可以刺激增殖和分化,同时抑制凋亡^[29]。此外,PI3K/AKT 通路可影响破骨细胞形成^[30]。相反,AKT 的激活通过阻断小鼠成骨细胞磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 3-磷酸酶的表达来增加骨量^[31]。最近关于 PI3K 信号通路的研究均强调了 PI3K/AKT 信号通路在骨质疏松中的参与^[32]。因此,无论在正常还是病理条件下,PI3K/AKT 通路都是维持骨稳定性的关键。

综上所述,ASA 能促进骨质疏松模型 rBMSCs 增殖,增强 ALP 活性,增强 ALP、OPN 和 RUNX2 的表达,而 PI3K 通路抑制剂 wortmannin 降低了这些成骨作用,并降低了 ASA 诱导的 PI3K、p-AKT 水平,表明 ASA 通过 PI3K/AKT 信号通路促进骨质疏松模型 rBMSCs 成骨分化。

参考文献(References)

- [1] He J, Xu S, Zhang B, et al. Gut microbiota and metabolite alterations associated with reduced bone mineral density or bone metabolic indexes in postmenopausal osteoporosis[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(9): 8583-8604
- [2] Roh YH, Lee ES, Ahn J, et al. Factors affecting willingness to get assessed and treated for osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2019, 30(7): 1395-1401
- [3] 《中国老年骨质疏松症诊疗指南》(2018)工作组,中国老年学和老年医学学会骨质疏松分会,马远征,等.中国老年骨质疏松症诊疗指南(2018)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(12): 1541-1567
- [4] 吴铭,张岩.调控骨髓间充质干细胞成骨分化的 Wnt/ β -catenin 信号通路及相关因素[J].中国组织工程研究, 2021, 25(1): 116-122
- [5] Li H, Wu W, He X, et al. Applying vibration in early postmenopausal osteoporosis promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and suppresses postmenopausal osteoporosis progression[J]. Biosci Rep, 2019, 39(9): BSR20191011
- [6] Zhao B, Xing G, Wang A. The BMP signaling pathway enhances the osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with osteoporosis[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 462
- [7] 马丹.川续断皂苷VI对人牙周膜干细胞增殖和成骨向分化的影响及其机制研究[D].山东大学, 2020
- [8] Niu Y, Li Y, Huang H, et al. Asperosaponin VI, a saponin component from *Dipsacus asper* wall, induces osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway[J]. Phytother Res, 2011, 25(11): 1700-1706
- [9] Xi JC, Zang HY, Guo LX, et al. The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 640-645
- [10] 陈巧玲,白亦光,别俊,等.靶向抑制 Akt 对成骨细胞分化 PI3K/Akt 信号通路调控的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(12): 2123-2128
- [11] 张卫华,陈东.体外冲击波联合富血小板血浆对骨质疏松骨折大鼠骨愈合的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(3): 422-427
- [12] Patel A, Silverman S, Baghdadi J, et al. Osteoporotic Fracture Risk and Health Care Burden in Patients With Cirrhosis [J]. J Clin Gastroenterol, 2019, 53(7): 543-548
- [13] Lu J, Ren Z, Liu X, et al. Osteoporotic Fracture Guidelines and Medical Education Related to the Clinical Practices: A Nationwide Survey in China[J]. Orthop Surg, 2019, 11(4): 569-577
- [14] Wang X, Li C, He Y, et al. Anti-osteoporosis medication treatment pattern after osteoporotic fracture during 2010-2016 in Fujian, China [J]. Arch Osteoporos, 2020, 15(1): 134
- [15] 贾文斌,刘超,邹燕.抗骨质疏松治疗药物研究的新进展[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(6): 490-494, 542
- [16] 王志鹏,宋敏,赵文韬,等.骨质疏松症药物治疗的有限元分析研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(7): 971-974, 980
- [17] 赵金龙,梁桂洪,韩燕鸿,等.川续断提取物续断皂苷VI防治骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(5): 755-759
- [18] 汪文来,鞠大宏,刘梅洁,等.续断有效成分药理学研究进展[J]. 中国医药导刊, 2015, (10): 1059-1060
- [19] Liu ZG, Zhang R, Li C, et al. The osteoprotective effect of Radix Dipsaci extract in ovariectomized rats [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123(1): 74-81
- [20] Niu YB, Kong XH, Li YH, et al. Radix Dipsaci total saponins stimulate MC3T3-E1 cell differentiation via the bone morphogenetic protein-2/MAPK/Smad-dependent Runx2 pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4468-4472
- [21] Ma D, Wang X, Ren X, et al. Asperosaponin VI Injection Enhances Orthodontic Tooth Movement in Rats [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e922372
- [22] Liu K, Liu Y, Xu Y, et al. Asperosaponin VI protects against bone destructions in collagen induced arthritis by inhibiting osteoclastogenesis[J]. Phytomedicine, 2019, 63: 153006
- [23] Fang Y, Xue Z, Zhao L, et al. Calycosin stimulates the osteogenic differentiation of rat calvarial osteoblasts by activating the IGF1R/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Cell Biol Int, 2019, 43(3): 323-332
- [24] Li C, Tian J, Li G, et al. Asperosaponin VI protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt and CREB pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1-3): 100-107
- [25] Zhao Y, Xu Y, Zheng H, et al. QingYan formula extracts protect against postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rat model via active ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113644
- [26] Kong Y, Nie ZK, Li F, et al. MiR-320a was highly expressed in postmenopausal osteoporosis and acts as a negative regulator in MC3T3E1 cells by reducing MAP9 and inhibiting PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Mol Pathol, 2019, 110: 104282
- [27] 何艳,布海切木·卡德尔,周晓珊,等.藏红花素通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制成骨细胞凋亡引起的骨质疏松 [J]. 医学研究杂志, 2021, 50(1): 85-90, 96
- [28] Ma Y, Ran D, Zhao H, et al. Cadmium exposure triggers osteoporosis in duck via P2X7/PI3K/AKT-mediated osteoblast and osteoclast differentiation[J]. Sci Total Environ, 2021, 750: 141638
- [29] Yin R, Jiang J, Deng H, et al. miR-140-3p aggregates osteoporosis by targeting PTEN and activating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Hum Cell, 2020, 33(3): 569-581
- [30] Wang Y, Han X, Zang T, et al. miR-29b enhances the proliferation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with castration-induced osteoporosis through the PI3K/AKT and TGF- β /Smad signaling pathways [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(4): 3185-3195
- [31] Xi J, Li Q, Luo X, et al. Celastrol inhibits glucocorticoid-induced osteoporosis in rat via the PI3K/AKT and Wnt signaling pathways[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(5): 4753-4759
- [32] 林德民,谢兴文,李宁,等. PI3K/AKT 通路及骨质疏松症的关系及中医药干预的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(6): 922-926