

· 基础研究 ·

壮骨止痛方对体外培养成骨细胞
Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

彭 昕 曾锦宁 张叔琦 袁丽瑶 张国民

摘要 **目的** 观察壮骨止痛方对体外培养成骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法** 取新生 SD 大鼠颅骨进行成骨细胞原代培养,传代后随机分为 4 组:假手术组、模型组、对照组、中药组。培养 3 代后进行鉴定,加入相应含药血清干预 48 h。测定各组成骨细胞 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β mRNA 及蛋白的表达情况。**结果** 与假手术组比较,模型组 β -catenin、LRP5 蛋白及 mRNA 降低($P < 0.05$),GSK3 β 蛋白及 mRNA 升高($P < 0.05$)。与模型组比较,对照组和中药组 β -catenin、LRP5 蛋白及 mRNA 表达升高($P < 0.05$),GSK3 β 蛋白表达降低($P < 0.05$),中药组 GSK3 β mRNA 表达降低($P < 0.05$)。与对照组比较,中药组 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达升高($P < 0.05$),GSK3 β mRNA 表达降低($P < 0.05$)。**结论** 壮骨止痛方可通过上调 Wnt3a、 β -catenin、LRP5 蛋白的表达,下调 GSK3 β 的表达调控 Wnt/ β -catenin 信号通路。

关键词 壮骨止痛方;骨质疏松症;成骨细胞;Wnt/ β -catenin 信号通路

Effect of Zhuanggu Zhitong Recipe on Wnt/ β -catenin Signaling Pathway of Osteoblast Cultured *in Vitro* PENG Xin, ZENG Jin-ning, ZHANG Shu-qi, YUAN Li-yao, and ZHANG Guo-min Medical College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Zhuanggu Zhitong Recipe (ZGZTR) on Wnt/ β -catenin signaling pathway of osteoblast cultured *in vitro*. **Methods** Osteoblasts from neonatal SD rats were cultured in primary culture then divided into 4 groups randomly, sham-operated group, model group, control group and Chinese medicine (CM) group. Osteoblasts were identified after 3 generations, then intervened by drug containing serum for 48 h. The mRNA and protein expression of Wnt3a, β -catenin, LRP5, GSK3 β were detected. **Results** Compared with sham-operated group, the protein and mRNA expression of β -catenin, LRP5 decreased ($P < 0.05$), GSK3 β mRNA and protein increased in model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the mRNA and protein expression of β -catenin, LRP5 increased ($P < 0.05$), the protein expression of GSK3 β decreased in control group and CM group ($P < 0.05$); the mRNA expression of GSK3 β decreased in CM group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA and protein expression of β -catenin increased ($P < 0.05$), and GSK3 β mRNA expression decreased ($P < 0.05$) in CM group. **Conclusion** ZGZTR can regulate the Wnt/ β -catenin signaling pathway by raising the expressions of protein Wnt3a, β -catenin, LRP5 and reducing the expression of GSK3 β .

KEYWORDS Zhuanggu Zhitong Recipe; osteoporosis; osteoblasts; Wnt/ β -catenin signaling pathway

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是绝经后妇女的常见病及多发病,是临床表现为骨折易感性和骨脆性增加的一种代谢性疾病^[1]。Wnt/ β -catenin 信号通路对骨骼的发生发展起着决定性的作用,尤其是在促进成骨细胞的成熟方面。Wnt/ β -catenin 信号通路的激活可能成为抗骨质疏松药物的重要治疗手段之一^[2]。壮骨止痛方在古方补骨脂丸的基础上研制而成^[3],为进一步探明其主要成分及作用机制,本课题组采用体外成骨细胞原代培养和中药血清药理学相结合的方法,研究壮骨止痛方对体外原代培养成骨细胞 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β mRNA 及蛋白表达的影响,探讨其具体作用机制。

基金项目:湖南省中医药科研计划重点项目(No. 201612);湖南省教育厅重点课题(No. 20161616)

作者单位:湖南中医药大学医学院(长沙 410208)

通讯作者:张国民, Tel: 13574819158, E-mail: 834095773@qq.com

DOI:10.7661/j. cjm. 20170713. 180

材料与方法

1 实验动物 12 月龄 SD 雌性大鼠, 体重(250 ± 17)g, 新生 24 h SPF 级 SD 大鼠, 均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(湘)2011-0003。所有动物采用水合氯醛腹腔注射麻醉, 处死方式均为注射过量水合氯醛, 集中焚烧动物尸体。动物实验参考《关于善待实验动物的指导性意见》。

2 试剂及仪器 DMEM 低糖培养基(批号: 11885-076, Gibco 公司); 胎牛血清(批号: 16000-044, 浙江天航生物科技有限公司); 青霉素-链霉素混合溶液(批号: RY0017, 北京 Leagene 公司); 胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号: T1300, 北京 Solarbio 公司); II 型胶原酶(批号: Sigma-C-6885, Sigma 公司); 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP) 测试盒(批号: A059-2, 南京建成生物工程研究所); 大鼠 Wnt3a 一抗(批号: BA2618-1, Boster 公司); 大鼠 β -catenin 一抗(批号: 120-27-1000, 美国 Protein Tech 公司); 大鼠 LRP5、GSK3 β 一抗(批号: AF1635a, 北京 Bioss 公司); 兔 SP 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(批号: ZLI-9018, 北京中杉金桥公司); 0.2% 茜素红染色液(批号: UFJ01536, 北京 Solarbio 公司); TRIzol RNA 提取液(批号: 15596-026, 美国 Ambion 公司); 逆转录试剂盒(批号: A3500, 美国 Promega 公司); Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β 引物(生工生物工程股份有限公司)。倒置相差显微镜(AE30/31, 北京 Motic 公司); PCR 仪(MultiGene II, 美国 Labnet 公司); 酶标仪(型号: SpectraMax M5, 美国 Molecular Devices 公司); 电泳仪(DYCZ-25E 型, 北京市六一仪器厂); 生物电泳图像分析系统(型号: FR-980B, 上海复日科技有限公司)。

3 药物 壮骨止痛方原材料购自湖南中医药大学第一附属医院, 包括补骨脂、淫羊藿、狗脊、枸杞子、川牛膝、女贞子、骨碎补, 具体配伍参照国家新药证书[国药证字 Z20050125]。阳性对照药为尼尔雌醇片(2 mg, 廊坊高博京邦制药有限公司, 批号: 140101)。

4 含药血清制备 12 月龄 SD 雌性大鼠 24 只, 随机分为 4 组: 假手术组、模型组、对照组、中药组。模型组、对照组、中药组大鼠摘除双侧卵巢, 假手术组在相应位置摘除相应体积脂肪。中药组大鼠每日灌胃壮骨止痛方[6.6 mg/(kg·d), 5 mL], 对照组大鼠灌胃尼尔雌醇[5 mg/(kg·d), 5 mL], 假手术组、模型组灌胃生理盐水 5 mL, 连续干预 13 周后, 经腹主动脉取血, 静置 30 min 后, 于 4℃ 离心 15 min 取上层血清。

5 成骨细胞的分离与培养 取新生 SD 大鼠乳鼠 8 只, 于 75% 乙醇中浸泡 5 min 作消毒处理, 于 PBS 皿中打开大鼠头顶皮肤, 取出双侧顶骨, 放入 PBS 液中。刮除附着组织至骨质发白透亮后剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右的小块, 转移至装有 0.25% 胰酶的 BD 管中, 于 37℃ 消化 30 min, 期间震荡 1 次。离心去酶后, 加入 PBS 液洗涤 1 次, 离心后加入 0.1% II 型胶原酶, 于 37℃ 水浴 1 h, 期间震荡 1 次。离心去酶并用 PBS 液洗涤后, 移入 50 mL 细胞培养瓶内, 12% 胎牛血清 DMEM 低糖培养液于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。2 天后换液 1 次, 之后每周换液 1 次。待细胞铺满底壁约 80% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代, 2 天后换液。当细胞贴壁较紧时, 采用胰蛋白酶消化 1 min 后结合细胞刮刀刮取细胞。进一步传代后随机分为 4 组, 即假手术组、模型组、对照组、中药组, 采用相应血清培养细胞。

6 成骨细胞鉴定 培养细胞待骨片周围爬出细胞后, 于 100 倍倒置相差显微镜下观察成骨细胞的形态、排列并拍照。根据 AKP 测试盒说明书指示进行操作。从细胞培养瓶中取培养液, 离心后取上清, 加入 AKP 检测试剂后 37℃ 水浴 15 min, 490 nm 酶标仪测定各孔吸光值。成骨细胞体外培养至 18 天, 进行茜素红染色。将细胞用 75% 乙醇固定后, 双蒸水冲洗 3 次, 加入茜素红染液于 37℃ 孵育 30 min 后观察。

7 含药血清干预 成骨细胞传代贴壁 24 h 后, 于培养液中添加相应 15% 含药血清, 培养 48 h。

8 蛋白表达检测 采用免疫组织化学技术检测各组成骨细胞 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β 蛋白表达, DAB 显色后呈棕黄色者为阳性结果。每张切片放大 400 倍后随机选择 5 个视野进行图像分析, 检测 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β 蛋白的阳性表达率并测出平均灰度值, 进行数据分析。

9 mRNA 检测 用 TRIzol 提取成骨细胞 RNA 后, 使用分光光度计测量 RNA OD 值, 调节各组 RNA 浓度在同一水平。同时取各组 RNA 做琼脂糖凝胶电泳, 以确保 RNA 的完整性。根据逆转录试剂盒(Promega 公司)完成逆转录, 形成 cDNA, 与 -20℃ 保存。使用前按照说明书将 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β 引物溶解, 各目的基因与参照基因 GAPDH 的引物序列见下表(表 1)。PCR 反应体系共 20 μ L, 包括 Rnase Free 水 7 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, Taq PCR MasterMix 10 μ L (TaqDNA 聚合酶 0.1 U/ μ L), 模板 1 μ L。使用 PCR 仪进行扩增后进行电泳。电泳完成的琼脂糖凝胶使用生物电泳图像分析系统进行拍照及图像分析。

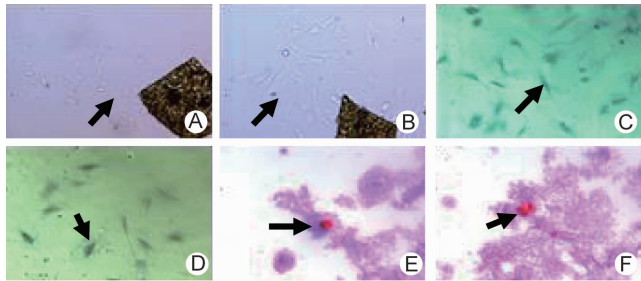
表 1 各引物序列

基因		引物序列	引物长度 (bp)
Wnt3a	正向	5'-CGGGTTTCTACCTGATGGTG-3'	123
	反向	5'-CTTACCTGTCTCCGTTTGAGC-3'	
β-catenin	正向	5'-GTGCAATTCCCTGAGCTGACC-3'	184
	反向	5'-CGGGCTGTTTCTACGTCATT-3'	
LRP5	正向	5'-CTTCCCACTACACGCTGGAC-3'	163
	反向	5'-TTGATGGCTTTGACATTCTC-3'	
GSK3β	正向	5'-TCCGATTGCGGTATTTCTTC-3'	130
	反向	5'-AGTGTCTGCTTGGCTCGACT-3'	
GAPDH	正向	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	303
	反向	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

10 统计学方法 使用 SPSS 22.0 进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验法进行组间分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

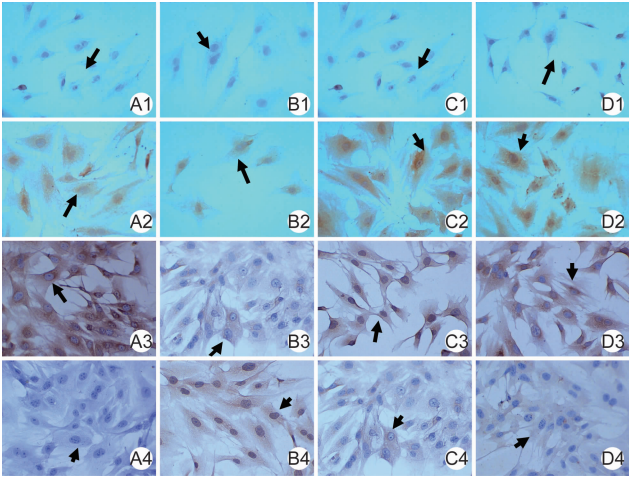
结 果

1 成骨细胞鉴定结果(图 1) 原代培养 24 h 后即可见骨片上爬下来的呈多角形或星形的细胞。培养 72 h 后,明显可见在骨片周围排列紧密的细胞。空白对照中 AKP 活性值为 0,标准对照为 2,所测定培养液中 AKP 活性平均值为 1.29,具有很强的 AKP 活性。AKP 染色后,着色部分呈墨绿色。茜素红染色后,形成了红色钙化结节。



注: A、B 为成骨细胞,箭头所指即是;C、D 为成骨细胞,AKP 染色;E、F 为钙化结节,茜素红染色
图 1 成骨细胞鉴定结果 (×100)

2 各组 Wnt3a、β-catenin、LRP5、GSK3β 蛋白表达比较(图 2,表 2) Wnt3a、β-catenin 蛋白染色以假手术组最深,中药组、对照组、模型组染色均较浅。中药组、对照组、假手术组 LRP5 蛋白免疫组化染色着色明显高于模型组。GSK-3β 蛋白模型组染色最深,中药组、对照组、假手术组染色均较浅。与假手术组比较,模型组 β-catenin、LRP5 蛋白降低($P < 0.05$),GSK3β 蛋白升高($P < 0.05$)。与模型组比较,对照组和中药组 β-catenin、LRP5 蛋白升高($P < 0.05$),GSK3β 蛋白降低($P < 0.05$)。与对照组比较,中药组 β-catenin 蛋白升高($P < 0.05$)。



注: A 为假手术组;B 为模型组;C 为对照组;D 为中药组;1 为 Wnt3a;2 为 β-catenin;3 为 LRP5;4 为 GSK3β;箭头所指为蛋白表达

图 2 各组 Wnt3a、β-catenin、LRP5、GSK3β 蛋白表达 (免疫组化,×400)

表 2 各组免疫组化染色 Wnt3a、β-catenin、LRP5、GSK3β 蛋白灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Wnt3a	β-catenin	LRP5	GSK3β
假手术	10	73 ± 7	116 ± 9 *	121 ± 5 *	68 ± 7 *
模型	10	68 ± 4	87 ± 6	91 ± 16	120 ± 6
对照	10	71 ± 6	113 ± 6 *	116 ± 7 *	73 ± 6 *
中药	10	72 ± 8	121 ± 8 *△	118 ± 5 *	75 ± 8 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,△ $P < 0.05$

3 各组 Wnt3a、β-catenin、LRP5、GSK3β mRNA 表达比较(图 3,表 3) 与假手术组比较,模型组 β-catenin、LRP5 mRNA 降低($P < 0.05$),GSK3β mRNA 升高($P < 0.05$)。与模型组比较,对照组和中药组 β-catenin、LRP5 mRNA 升高($P < 0.05$),中药组 GSK3β mRNA 降低($P < 0.05$)。与对照组比较,中药组 β-catenin 升高($P < 0.05$),GSK3β mRNA 降低($P < 0.05$)。

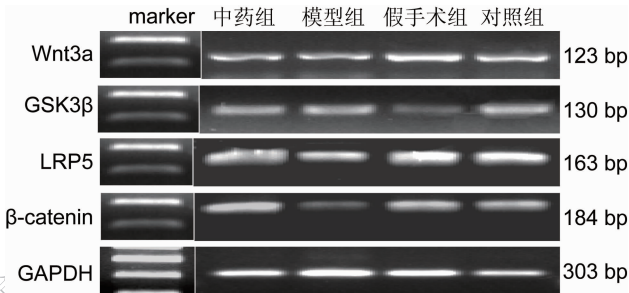


图 3 各组 Wnt3a、β-catenin、LRP5、GSK3β mRNA 表达

表 3 各组 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β mRNA 表达比较

组别	n	Wnt3a	β -catenin	LRP5	GSK3 β
假手术	10	0.82 $\pm$ 0.25	0.85 $\pm$ 0.19 *	1.52 $\pm$ 0.23 *	0.45 $\pm$ 0.16 *
模型	10	0.73 $\pm$ 0.24	0.47 $\pm$ 0.24	1.18 $\pm$ 0.35	0.85 $\pm$ 0.25
对照	10	0.72 $\pm$ 0.31	0.81 $\pm$ 0.18 *	1.47 $\pm$ 0.21 *	0.79 $\pm$ 0.18
中药	10	0.73 $\pm$ 0.16	1.35 $\pm$ 0.23 * Δ	1.38 $\pm$ 0.24 *	0.68 $\pm$ 0.20 * Δ

注:与模型组比较, * $P < 0.05$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

中医治疗 PMOP 宜补肾阴、温肾阳、滋补肝肾以活血化瘀、壮骨止痛^[4]。壮骨止痛方主要由淫羊藿、补骨脂、狗脊、川牛膝等组成,以归肝肾之经的淫羊藿为君药^[5],具有大温之性的补骨脂、强腰脊的狗脊共为臣药,以滋补肝肾的枸杞子、女贞子为佐药,骨碎补、川牛膝共为佐使药,标本兼治,攻补兼施。以治本温补为主,治标攻邪为次^[6]。Wnt/ β -catenin 信号通路及其配体在成骨细胞的增殖、分化中起着关键的作用,调控着骨骼的发生、发展、修复^[7]。Wnt 信号通路的组成包括 6 个部分:Wnt、Wnt 膜表面受体——LRP、 β -catenin、GSK-3 β 、酪蛋白激酶、胞质调节蛋白、转录因子^[8]。 β -catenin 起到正向调节的作用,而 GSK-3 β 、APC、Axin 等的激活则会抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。 β -catenin 等正向调节蛋白能通过激活 T 细胞因子和淋巴样增强子结合蛋白等转录因子来促进下游靶基因 c-myc、cyclinD1 基因的表达,从而促进细胞增殖^[9,10]。若 Axin/APC/GSK-3 降解复合体使 β -catenin 蛋白出现泛素化和磷酸化,导致其被降解。研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通路与成骨细胞的发育、分化、成熟以及骨基质的矿化高度相关^[11],有研究发现淫羊藿苷、淫羊藿黄酮以及骨碎补总黄酮均能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路作用于骨髓间充质干细胞,使之向成骨细胞分化^[12]。招文华等^[13]研究显示,骨碎补能通过调控 OPG/RANKL/RANK 通路、组织蛋白酶 K 通路、Wnt/ β -catenin 通路等通路上的相关靶点,从而发挥抗骨质疏松的作用。

本实验进行成骨细胞的原代培养后,测定了成骨细胞的 AKP 含量,同时进行了 AKP 染色和茜素红染色,确定了培养的细胞为成骨细胞。细胞培养一段时间后,进行了 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β 蛋白的免疫组化染色和 RT-PCR,研究结果显示,中药组 Wnt3a、 β -catenin、LRP5 表达均高于模型组,提示壮骨止痛方能正向调节 Wnt3a、 β -catenin、LRP5 蛋白的表达,略高于对照组,表明壮骨止痛方对于 PMOP 的有效,可能有类似雌激素的作用。GSK3 β 表达在假手术组最低,对照组又低于中药组,在模型组最高,

提示壮骨止痛方与雌激素均能负向调节 GSK3 β 蛋白的表达。本实验对 Wnt3a、 β -catenin、LRP5、GSK3 β 蛋白的研究,仅从免疫组化染色及逆转录 PCR 这两个方面来探讨,有一定的局限性,且 Wnt/ β -catenin 信号通路尚有诸多分子,壮骨止痛方对其作用机制尚不明朗,有待后续进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Tian J, Xu XJ, Shen L, et al. Association of Serum Dkk-1 levels with β -catenin in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. J Huazhong Univ Sci Tech, 2015, 35(2): 212–218.
- [2] 贾忠宝, 张柳, 田发明. Wnt/ β -catenin 信号通路主要因子与成骨细胞研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(1): 90–94.
- [3] 甘国兴, 莫新民, 李劲平, 等. 壮骨止痛方药效部位的筛选及其对骨质疏松雌鼠骨代谢相关激素的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 126–130.
- [4] 盛彤, 谢培凤, 王新祥, 等. 骨质疏松症中医脾虚病机认识的现代医学基础 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(5): 509–513.
- [5] 尤志强, 林松青, 王彬, 等. 淫羊藿苷抗骨质疏松症相关信号通路机制的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(10): 190–193.
- [6] 郭文清, 何保丽. 中医药防治骨质疏松症动物模型研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 666–668.
- [7] 周君, 何红晨, 刘慧芳, 等. 去卵巢对大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(8): 2152–2154.
- [8] Chang MK, Kramer I, Keller H, et al. Reversing LRP5-dependent osteoporosis and SOST deficiency-induced sclerosing bone disorders by altering WNT signaling activity [J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(1): 29–42.
- [9] 沈蓝, 韩雨杉, 赵宏斌, 等. 中药治疗骨质疏松性骨折中 Wnt/ β -catenin 通路的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 2434–2436.
- [10] Walsh GM. Treatment options for postmenopausal osteoporosis [J]. Ther Clin Risk Manag, 2012, 8: 367–368.
- [11] Zahoor M, Cha PH, Min DoS, et al. Indirubin-3'-oxime reverses bone loss in ovariectomized and hindlimb-unloaded mice via activation of the Wnt/ β -catenin signaling [J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(5): 1196–1205.
- [12] 曾建春, 曾意荣, 樊粤光, 等. 淫羊藿甙诱导 MSCs 向成骨细胞分化过程中对 Wnt 信号通路的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(4): 607–611, 678.
- [13] 招文华, 沈耿杨, 任辉, 等. 骨碎补活性单体成分调控骨质疏松症相关信号通路的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(1): 122–129.

(收稿: 2016-07-30 修回: 2017-07-05)

责任编辑: 赵芳芳