

· 基础研究 ·

基于转录组学筛选左归丸促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖分化的关键基因

霍少川¹ 熊 仪¹ 俞建萍¹ 郭 海² 廖昔威¹ 程文昌¹ 钟嘉漫³ 温刘莹¹ 黄婷婷³ 韩 霞¹

摘要 目的 探讨左归丸治疗骨质疏松 (OP) 多靶点的分子机制。方法 采用 0、100、200、400、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞, Western Blot 检测总 β -连环蛋白 (β -catenin)、活性 β -catenin、成骨细胞特异性转录因子 2 (Runx2)、成骨细胞特异性转录因子 (Osx) 蛋白表达, qPCR 检测 Runx2、Osx、II 型 α 胶原蛋白基因 (Col2a1)、骨钙蛋白 (Ocn)、 β -catenin mRNA 表达, CCK-8 检测 MC3T3-E1 细胞增殖活力, 碱性磷酸酶 (ALP) 染色及茜素红染色 (ARS) 检测 MC3T3-E1 细胞成骨细胞分化能力, RNA-Seq 筛选左归丸促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖分化的差异基因并进行 qPCR 验证。结果 不同浓度左归丸溶液 (100、200、400、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 干预 MC3T3-E1 细胞 48 h, 成骨标志基因 (Runx2、Osx、Col2A1、Ocn、 β -catenin) 表达水平明显升高 ($P<0.05$), MC3T3-E1 细胞增殖率明显升高 ($P<0.05$), ALP、ARS 染色明显增强 ($P<0.05$), 其中以 400 $\mu\text{g/mL}$ 左归丸溶液干预效果最明显。当左归丸溶液干预浓度达到 1 000 $\mu\text{g/mL}$, MC3T3-E1 细胞成骨分化能力显著下降 ($P<0.05$)。采用 400 $\mu\text{g/mL}$ 左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞 48 h, RNA-seq 筛选出 10 个差异最大基因, 其中 6 个上调基因和 4 个下调基因, qPCR 验证发现, EF-Hand 钙结合域 9 (Efcab9)、叉头框蛋白 J1 (Foxj1) mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), Ras 蛋白特异性鸟嘌呤核苷酸释放因子 1 (RasGRF1)、生长分化因子 -9 (GDF9)、IV 型胶原蛋白 α -3 链 (Col4a3) mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$)。结论 左归丸溶液 (400 $\mu\text{g/mL}$) 能够调节 Efcab9、FOXJ1、RasGRF1、GDF-9、Col4a3 mRNA 表达水平, 促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖分化。

关键词 左归丸; MC3T3-E1 细胞; 转录组学; 成骨分化; 中药复方; 骨质疏松

Transcriptomics-based Screening of Key Genes for Promoting Osteoblast Proliferation And Differentiation in MC3T3-E1 Treated by Zuogui Pill HUO Shao-chuan¹, XIONG Yi¹, YU Jian-ping¹, GUO Hai², LIAO Xi-wei¹, CHENG Wen-chang¹, ZHONG Jia-man³, WEN Liu-ying¹, HUANG Ting-ting³, and HAN Xia¹ 1 Research Institute of Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (Futian), Shenzhen (518000); 2 Orthopedics Department, Liuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangxi (545001); 3 The Sixth Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen (518000)

ABSTRACT Objective To investigate the molecular mechanism of osteoporosis (OP) in MC3T3-E1 regulated by Zuogui Pill solution. **Methods** MC3T3-E1 cells were treated with Zuogui Pill solution at concentrations of 0, 100, 200, 400, and 1 000 $\mu\text{g/mL}$. Western Blot was performed to assess the protein expressions of total β -catenin, active β -catenin, Runt-related transcription factor 2 (Runx2), and osxterix (Osx). qPCR was used to detect the mRNA expressions of Runx2, Osx, type II alpha 1 collagen gene

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No. 82004395); 中国博士后科学基金及出站博士后科研资助 (No. 2018M633088); 广东省中医药局科研项目 (No. 20212203); 深圳市福田区卫生公益性科研项目 (No. FTWS2020058, No. FTWS2020037)

作者单位: 1. 广州中医药大学深圳医院 (福田) 研究院 (深圳 518000); 2. 柳州市中医医院骨伤科 (广西 545001); 3. 广州中医药大学第六临床医学院 (深圳 518000)

通讯作者: 韩 霞, Tel: 0755-83548683, E-mail: 957848451@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20231107.307

(Col2a1), osteocalcin (Ocn), and β -catenin. The proliferation activity of MC3T3-E1 cells was measured using CCK-8 assay, while alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining (ARS) were used to evaluate the osteoblast differentiation ability. Differential gene expression related to MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation induced by Zuogui Pill solution was confirmed through qPCR analysis of RNA-Seq results.

Results Different concentrations of Zuogui Pill solutions (0, 100, 200, 400, 1 000 $\mu\text{g/mL}$) were used to treat MC3T3-E1 cells for 48 hours, the expression levels of osteogenic marker genes (Runx2, Osx, Col2A1, Ocn, β -catenin) were significantly increased ($P<0.05$). Additionally, the proliferation rate of MC3T3-E1 cells was significantly increased ($P<0.05$), and ALP and ARS showed significant enhancement ($P<0.05$). Notably, the intervention effect of the 400 $\mu\text{g/mL}$ Zuogui Pill solution was the most prominent among the tested concentrations. The osteogenic differentiation ability of MC3T3-E1 cells was significantly reduced ($P<0.05$) when the intervention concentration of Zuogui Pill solution reached 1 000 $\mu\text{g/mL}$. After being intervened with 400 $\mu\text{g/mL}$ Zuogui Pill solution for 48 h, RNA-seq analysis identified 10 genes with the most differential expression, including 6 up-regulated genes and 4 down-regulated genes. qPCR verification confirmed a significant increase in the mRNA expression levels of EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9 (Efcab9), forkhead box J1 (Foxj1) ($P<0.05$), while the mRNA expression levels of Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1 (RasGRF1), growth differentiation factor 9 (GDF9), and achain of type IV collagen (Col4a3) were significantly reduced ($P<0.05$).

Conclusion Zuogui Pill solution (400 $\mu\text{g/mL}$) can regulate the mRNA expression levels of Efcab9, FOXj1, RasGRF1, GDF-9, and Col4a3, and promote osteoblast proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells.

KEYWORDS Zuogui Pill; MC3T3-E1 cells; transcriptomics; osteogenic differentiation; Chinese herbal compound; osteoporosis

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量低, 骨微结构损坏, 骨脆性增加, 易于骨折为特征的全身性骨病^[1, 2]。OP 发病率高, 危害大, 严重影响患者的生命健康, 造成了沉重的家庭和社会负担^[3, 4]。西医药治疗 OP 可明显提高骨强度、减少骨丢失、防止骨折发生, 但其费用昂贵、靶点单一、不良反应较大等问题限制其在临床长期使用^[5]。中医药治疗 OP 疗效稳定, 不良反应小, 可以增加西药的作用效果, 同时减轻其不良反应^[6]。左归丸出自《景岳全书·新方八阵》^[7], 由熟地黄、山药、枸杞子、山萸肉、川牛膝、鹿角胶、龟板胶、菟丝子 8 味药物组成, 具有滋肾补阴的作用。左归丸治疗 OP 疗效确切, 不良反应较少, 安全性高, 患者依从性好, 可长期服用, 具有多靶点、多途径干预的特点和优势^[8]。目前, 对于左归丸治疗 OP 的药效成分及分子机制研究较为深入, 但尚未从全基因组水平探讨左归丸治疗 OP 的分子机制。因此, 本研究采用 RNA-seq 技术在全基因组水平筛选左归丸促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖分化的差异基因并进行验证, 深入探讨左归丸治疗 OP 的分子机制, 阐明其多靶点的分子基础, 促进中医药现代化进程。

材料与方法

1 细胞 MC3T3-E1 细胞 (武汉尚恩生物技术

有限公司, 纯度 100%, 货号: SNL-021)。

2 药物 左归丸 (组成: 熟地黄、菟丝子、牛膝、龟板胶、鹿角胶、山药、山萸肉、枸杞子, 北京同仁堂, 每 10 粒重 1 g, 产品批号: 19030018), 槲皮素 (MACKLIN, 中国, 纯度: 302.24%, 货号: Q817161)。将 1 g 左归丸置于 5 mL 50% 乙醇溶液中, 配制成浓度为 200 mg/mL 存储液, 置于超声破碎仪中促使左归丸充分溶解。超声破碎仪工作条件设为: 190 W, 超声 9 s, 停止 9 s, 持续 9 min, 重复 3 次。将超声处理后的左归丸溶液放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清, 于 0.22 μm 滤膜过滤, 分装于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 使用前稀释成所需实验浓度。

3 试剂及仪器 DMEM 细胞培养基 (Hyclone, 美国, 货号: SH30022.01B), 胎牛血清 (PAN, 德国, 货号: P30-3306), CCK-8 试剂盒 (Abclonal, 美国, 货号: RM02823), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色试剂盒 (Wako, 日本, 货号: 294-67001), 茜素红染色 (alizarin red staining, ARS) 试剂盒 (碧云天, 中国, 货号: C0148S), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, 美国, 货号: NCI3225CH), ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, 美国, 货号: 34095), 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒 (Abclonal, 美国, 货号: RK30120), cDNA 一链合成试

剂盒 (Abclonal, 美国, 货号: RK20429), 染料法定量 PCR 检测试剂盒 (Abclonal, 美国, 货号: RK21203)。乙腈 (MACKLIN, 中国, 货号: A801455-4L)、磷酸 (MACKLIN, 中国, 货号: C15196866)。

抗体及稀释比例如下: 非磷酸 (活性) β -连环蛋白 [non-phospho (active) β -Catenin] (Cell Signaling Technology, 美国, 货号: 8814S, 稀释比例 1:1 000), β -Catenin (Proteintech, 美国, 货号: 51067-2-AP, 稀释比例 1:1 000), 成骨细胞特异性转录因子 2 (Runx2, Cell Signaling Technology, 美国, 货号: 12556S, 稀释比例 1:1 000), 成骨细胞特异性转录因子 (osxterix, Osx, Abcam, 英国, 货号: ab22552, 稀释比例 1:1 000), GAPDH (Proteintech, 美国, 货号: 60004-1-Ig, 稀释比例 1:10 000), HRP 标记山羊抗兔 IgG (Abclonal, 美国, 货号: AS014, 稀释比例 1:50 000), HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (Abclonal, 美国, 货号: AS003, 稀释比例 1:50 000)。

超纯水仪 (Millipore, 美国, 型号: Milli-Q Advantage A10), 电子分析天平 (Sartorius, 德国, 型号: BT25S), 超声破碎仪 (Branson, 美国, 型号: S-450D), 水套式 CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Scientific, 美国, 型号: 8000), 多功能全波长酶标仪 (Thermo Scientific, 美国, 型号: Multiskan FC), 倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本, 型号: CKX53), 小型垂直电泳槽 (Bio-Rad, 美国, 型号: 1658004), 高灵敏度化学发光成像系统 (Bio-Rad, 美国, 型号: Chemidoc XRS+), 核酸定量仪 (Thermo Scientific, 美国, 型号: Nanodrop 2000), 梯度 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国, 型号: T100), 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国, 型号: Stepone Plus), 高效液相色谱仪 (悟空仪器, 中国, 型号: K2025)。

4 左归丸溶液有效成分检测

4.1 标准品溶液制备 精密称取槲皮素 4.8 mg, 加入 10 mL 甲醇定容, 配置成 480 μ g/mL 标准品母液 S1, 取标准品母液 1 mL, 加入 80% 甲醇水定容至 10 mL, 稀释成 48 μ g/mL 标准品溶液 S2; 各取标准品溶液 S2 0.1、0.2、0.5、1、2 mL 分别定容至 10 mL, 分别稀释成 0.48、0.96、2.40、4.80、9.60 μ g/mL 系列梯度浓度。

4.2 左归丸溶液制备 取左归丸, 粉碎成粉末, 精密称取样品 1.0381 g, 置于 15 mL 离心管中, 精密加入 10 mL 50% 甲醇溶液, 称定重量, 超声处理 60 min, 放冷后再称定重量, 用 50% 甲醇水补足减

失的重量, 摇匀, 3 000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 0.22 μ m 微孔有机滤膜过滤, 取续滤液进高效液相色谱仪测定。将制备左归丸样品、槲皮素对照品和空白甲醇溶液精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪, 结果进行对照分析。

5 成骨细胞培养与干预 MC3T3-E1 细胞采用含 10% FBS 和 90% DMEM 的细胞完全培养基于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。以 5×10^6 个/孔的密度接种到 6 孔板后采用左归丸溶液干预。将左归丸储存液采用培养基稀释为 100、200、400、1 000 μ g/mL 的浓度干预细胞, Western Blot、实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测 β -catenin、Runx2、Osx 的蛋白及基因表达。

5.1 Western Bot 检测蛋白表达 取 7×10^6 个 MC3T3-E1 细胞接种于 10 cm 培养皿中, 不同浓度左归丸溶液 (0、100、200、400、1 000 μ g/mL) 干预 48 h 后, 收取细胞沉淀。RIPA 蛋白抽提试剂盒抽提总蛋白, 按 BCA 蛋白质定量试剂盒说明书测定蛋白质浓度。配置 10% SDS-PAGE 胶后, 每孔加入 20 mg 蛋白, 进行电泳和转印; 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h 后, 将转印蛋白的 PVDF 膜进行一抗孵育, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动孵育过夜; 次日弃去抗体, TBS/Tween 缓冲液洗 PVDF 膜后, 加入二抗, 室温孵育 1 h 后, 使用 TBS/Tween 缓冲液洗膜, 在化学发光成像系统内发光、成像并分析条带灰度值, 以目标蛋白与内参蛋白灰度值比值表示待测蛋白相对表达水平。

5.2 qPCR 检测基因表达 MC3T3-E1 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 不同浓度左归丸溶液 (0、100、200、400、1 000 μ g/mL) 干预 48 h 后, 收取细胞沉淀, 按照细胞/组织总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞 RNA, 取 1 μ g RNA 按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA, 加入特异引物进行 qPCR 扩增, 引物设计见表 1。所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

6 CCK-8 法检测细胞活力 MC3T3-E1 细胞以 3×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 每组 6 个复孔, 分别采用 0、100、200、400、1 000 μ g/mL 左归丸溶液干预 48 h, 其中不接种细胞的孔作为测量初始值; 同时, 以 400 μ g/mL 左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞, 0、6、12、24、48、72 h 测细胞增殖活力, 按照 CCK-8 试剂盒说明书检测细胞增殖能力。细胞相对活力计算公式为: 细胞相对活力 (%) = [(实验组) - (空白对照)] / [(阴性对照 - 空白对照)] $\times$ 100%。

7 ALP 及 ARS 染色检测 MC3T3-E1 细胞以

表 1 荧光定量 PCR 引物序列表

基因	正向引物序列 (5' → 3')	反向引物序列 (5' → 3')	引物大小 (bp)
Runx2	AACGATCTGAGATTGTGGGC	CCTGCGTGGGATTCTTGTT	42
Osx	ATGGCGTCCTCTCTGCTTG	TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT	40
Col2a1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG	38
Ocn	AGGGAGGATCAAGTCCCCG	GAACAGACTCCGGCGCTA	36
β-cateinin	ATGGAGCCGGACAGAAAAGC	CTTGCCACTCAGGGAAGGA	39
Cyp11a	AGGTCCTTCAATGAGATCCCTT	TCCCTGTAAATGGGGCCATAC	43
Col4a3	CAAAGGCATCAGGGGAATAACT	ATCCGTTGCATCCTGGTAAAC	43
Tfcp2l1	CAGCCCGAACACTACAACCAG	CAGCCGGATTTCATACGACTG	42
Catip	CCTCAGGGGAACTGACCATT	TAGAGGCGTGGACCAGTAGAC	42
Efcab9	ACTCCGGGGTGTTCCTCTGTG	AGGAGGTCAAATATCATCCCGA	42
Ncf2	GCTGCGTGAACACTATCCTGG	AGGTCGTACTTCTCCATTCTGTA	44
Pdzk1ip1	TTGGCCTTCAGTCTGCTCG	CAGAAGTGGTTGACGGCGAA	39
Foxj1	CCCTGACGACGTGGACTATG	GCCGACAGAGTGATCTTGGT	40
RasGRF1	GCCAGAAGACTTGACAACGCT	TCAATCTACAGGGATGGTGGAAAG	44
Gdf9	TCTTAGTAGCCTTAGCTCTCAGG	TGTCAGTCCCATCTACAGGCA	44

注: Col2a1: II 型 α1 胶原蛋白基因 (type II alpha 1 collagen gene, Col2a1); Ocn: 骨钙蛋白 (osteocalcin, Ocn); Cyp11a: 细胞色素 P450 家族 11 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 11 subfamily a member 1, Cyp11a); Col4a3: IV 型胶原蛋白 α-3 链 (Achain of type IV collagen, Col4a3); Tfcp2l1: 转录因子 CP2-like 1 (transcription factor CP2-like 1, Tfcp2l1); Catip: 纤毛发生相关 TTC17 相互作用蛋白 (ciliogenesis associated TTC17 interacting protein, Catip); Efcab9: EF-Hand 钙结合域 9 EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9, Efcab9); Ncf2: 中性粒细胞胞浆因子 2 (neutrophil cytosolic factor 2, Ncf2); Pdzk1ip1: PDZK1 相互作用蛋白 1 (PDZK1 interacting protein 1, Pdzk1ip1); Foxj1: 叉头框蛋白 J1 (forkhead box J1, Foxj1); RasGRF1: Ras 蛋白特异性鸟嘌呤核苷酸释放因子 1 (Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1, RasGRF1); GDF-9: 生长分化因子 -9 (growth differentiation factor 9, GDF9)

4 × 10⁵ 个 / 孔的密度接种于 6 孔板中, 分别采用 0、100、200、400、1 000 μg/mL 处理 7 天后, 去除培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 蒸馏水洗涤 3 次后, 每孔加入适量茜素红 S 染色液或 ALP 染色液 1 mL, 室温染色 20 min。待染色完成后, 使用蒸馏水充分洗涤, 随后在显微镜下观察和拍照, 使用 Image J 软件计算阳性细胞面积。

8 基因信息检测

8.1 样本处理 将 MC3T3-E1 细胞按照 4 × 10⁵ / 孔的密度接种于 6 孔板后, 于 37℃ 细胞培养箱过夜。将细胞分为实验组及对照组, 实验组细胞中加入浓度为 400 μg/mL 左归丸溶液, 对照组则加入与药液等体积的 50% 乙醇 (0 μg/mL 左归丸溶液), 继续培养细胞 48 h。弃掉细胞培养基, PBS 洗涤细胞两次, 每孔中加入 1 mL Trizol 裂解细胞, 将裂解液收集到 1.5 mL 离心管, 由维真生物科技有限公司提取 RNA 并质检。RNA 质量检测合格后, 建库进而上机进行转录组测序。

8.2 差异表达基因分析 采用 DESeq 分析差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), DEGs 筛选以参考差异倍数 (fold change) 以及 q 值 (Padj, 矫正之后的 P 值) 作为主要选择指标, 通常选取 |log₂ Fold change| ≥ 1 和 q < 0.05 的 DEGs 作为显著 DEGs。

8.3 基因本体论 (gene onotology, GO) 分析 应用超几何检验对 DEGs 进行 GO 分析, 以校正后的 q < 0.05 为阈值, 满足此条件的 GO 词条被认为具有显著性。

9 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 并进行方差齐性检验, 若方差不齐则采用矫正值 t' 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 α = 0.05 为水准, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 左归丸溶液有效成分测定结果 (图 1) 左归

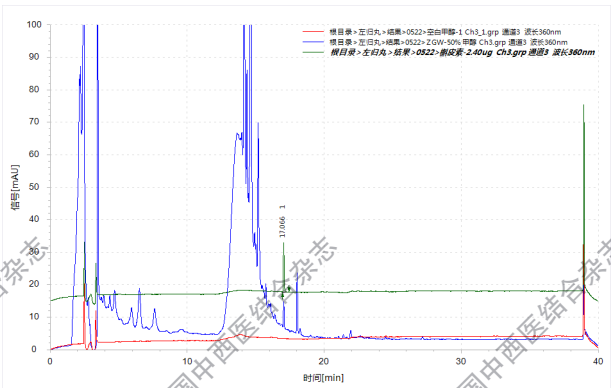
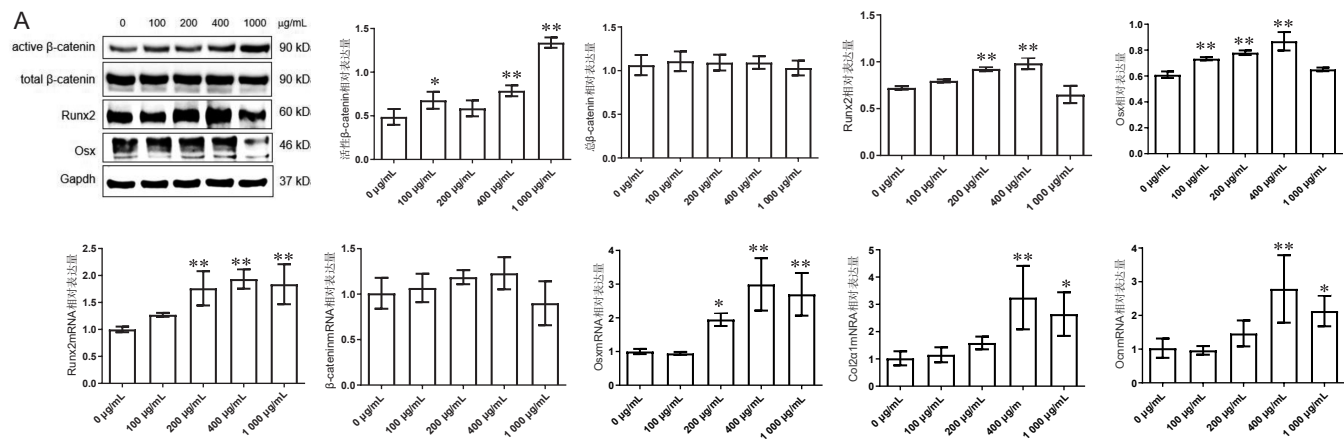


图 1 左归丸溶液高效液相色谱图



注：A 为 Western Blot 检测结果；其余柱状图为 qPCR 检测结果；与 0 μg/mL 左归丸溶液干预比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

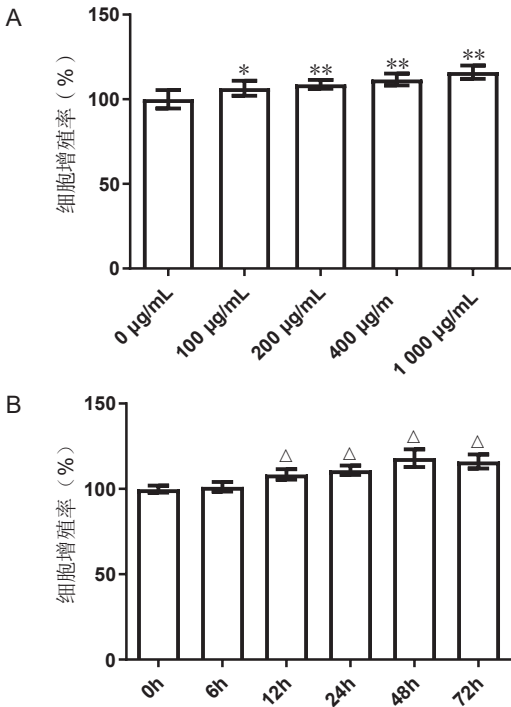
图 2 左归丸溶液对 MC3T3-E1 细胞骨形成标志基因的影响

丸样品溶液槲皮素保留时间为 18.05 min，与槲皮素对照品溶液一致，且槲皮素与其他组分峰较好的分离；空白甲醇溶液色谱图中，在与槲皮素对照品溶液保留时间相同的位置上未见干扰峰。左归丸溶液中含有槲皮素成分，且其他组分不干扰槲皮素含量测定。

2 左归丸溶液促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞分化最佳浓度的筛选结果（图 2） Western Blot 检测发现与 0 μg/mL 左归丸溶液干预比较，100、400、1 000 μg/mL 左归丸溶液干预时活性 β-catenin 蛋白表达升高，200、400 μg/mL 左归丸溶液干预时 Runx2 蛋白表达升高，100、200、400 μg/mL 左归丸溶液干预时 Osx 蛋白表达升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），总 β-catenin 蛋白表达各浓度间差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。qPCR 检测发现，200、400、1 000 μg/mL 左归丸溶液干预时 Runx2、Osx mRNA 表达升高，400、1 000 μg/mL 左归丸溶液干预时 Col2a1、Ocn mRNA 表达增高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），β-catenin mRNA 表达各浓度间比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

3 MC3T3-E1 细胞活力结果比较（图 3）与 0 μg/mL 左归丸溶液干预比较，100、200、400、1 000 μg/mL 左归丸溶液干预时细胞活力增加（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），但根据结果 2 浓度为 1 000 μg/mL 左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞相对于 400 μg/mL 浓度抑制成骨标志物表达。因此，采用 400 μg/mL 浓度的左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞 72 h。结果发现，左归丸溶液干预 12 h 后 MC3T3-E1 细胞活力明显升高（ $P<0.01$ ），其中 48 h 时 MC3T3-E1 细胞增殖率升高最明显。

4 MC3T3-E1 细胞 ALP、ARS 染色阳性细胞面积结果比较（图 4）随着左归丸浓度的增加，

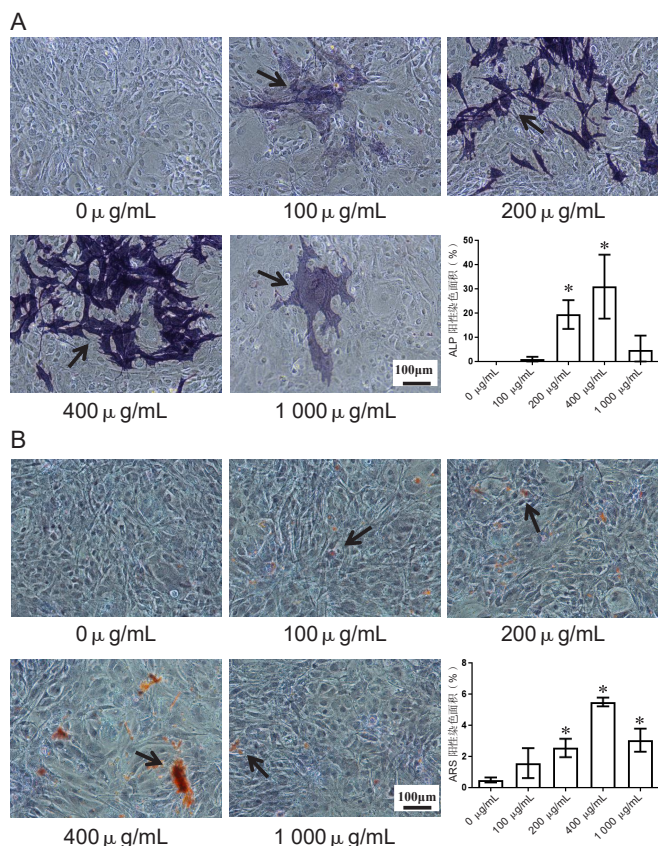


注：A 为不同浓度左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞 48 h；B 为 400 μg/mL 浓度左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞 72 h；与 0 μg/mL 左归丸溶液干预比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 0 μg/mL 左归丸溶液干预 0h 比较，Δ $P<0.01$

图 3 CCK-8 检测 MC3T3-E1 细胞增殖能力

ALP、ARS 染色程度，在 400 μg/mL 时达到高峰，1 000 μg/mL 时下降。与 0 μg/mL 左归丸溶液干预比较，200、400 μg/mL 左归丸溶液干预时 ALP 染色及 200、400、1 000 μg/mL 左归丸溶液干预时 ARS 染色阳性细胞面积增加（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。

5 左归丸溶液干预 MC3T3-E1 细胞后转录组学变化（图 5）根据倍数变化为 2（ $FDR \leq 0.05$ ）阈值筛选，在实验组与对照组细胞的比较中鉴定出 354 个差异表达基因，共筛选出 354 个差异表达基因，包括



注:A为ALP染色,箭头所指为细胞分泌的ALP;B为ARS染色,箭头所指为细胞表面沉积的钙化结节;与0 µg/mL左归丸溶液干预比较, * $P < 0.01$

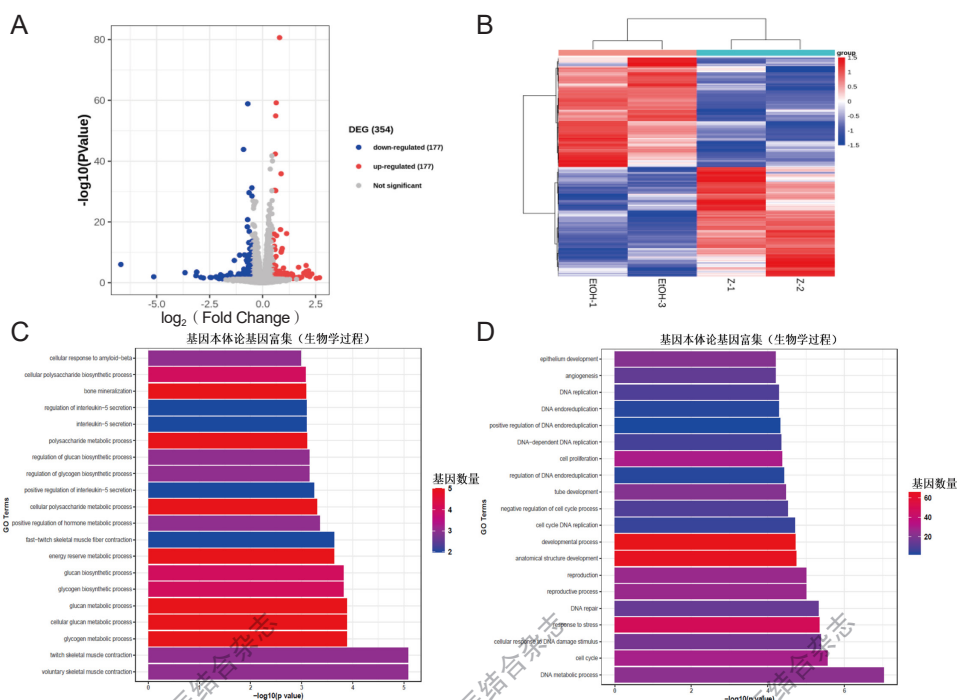
图4 左归丸溶液干预MC3T3-E1细胞后ALP、ARS染色结果($\times 200$)

177个上调基因和177个下调基因,层次聚类分析揭示了整体基因表达变化。GO分析结果显示,上调的DEGs主要富集在骨骼肌收缩、骨矿化、糖原代谢过程等生物过程,下调的DEGs主要富集在发育过程、解剖结构的发展、应激反应等生物过程。

表2 左归丸溶液处理MC3T3-E1细胞中Top10的DEGs

基因	ID	logFC	P值
Efcab9	ENSMUSG00000044056	2.68783	2.08E-02
Ncf2	ENSMUSG00000026480	2.53966	3.30E-02
Pdzk1ip1	ENSMUSG00000028716	2.10300	4.34E-04
Foxj1	ENSMUSG00000034227	2.04550	2.01E-04
RasGRF1	ENSMUSG00000032356	1.69982	8.12E-06
Gdf9	ENSMUSG00000018238	1.18417	1.44E-02
Cyp11a	ENSMUSG00000032323	-6.69539	9.54E-07
Col4a3	ENSMUSG00000079465	-2.47204	1.70E-02
Tfcp2l1	ENSMUSG00000026380	-1.72217	3.33E-02
Catip	ENSMUSG00000073650	-1.01072	9.47E-03

6 qPCR验证RNA-seq筛选的DEGs(图6,表2)经RNA-Seq测序,筛选出左归丸干预MC3T3-E1细胞48 h, 10个表达差异明显的基因,其中6个上调基因和4个下调基因。将10个差异性最大的基因进行qPCR检测,结果发现,与对照组比较,实验组Efcab9、Foxj1 mRNA表达水平升高($P < 0.05$), RasGRF1、GDF-9、Col4a3 mRNA表达水平降低($P < 0.05$)。



注:A为火山图,红点和绿点分别对应上调和下调的基因;B为层次聚类热图,Z-1、Z-2表示左归丸溶液处理的细胞样品,ETOH-1、ETOH-3表示50%乙醇溶液处理的细胞样品;C为上调基因功能性GO生物过程分析;D为下调基因功能性GO生物过程分析

图5 RNA-Seq测序结果

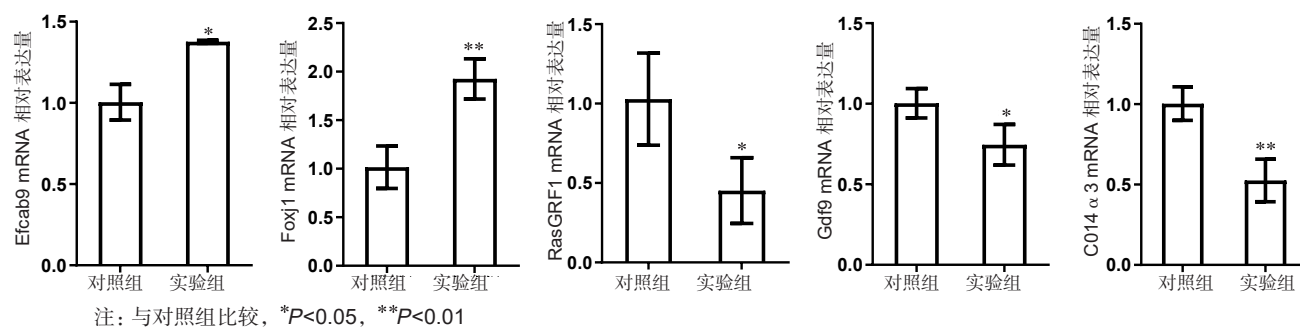


图 6 qPCR 验证 RNA-seq 筛选的 DEGs 表达水平

讨 论

OP 属于“骨痿”范畴，为本虚标实之证，病变之本在肾、肝、脾，血瘀为其标。中医学认为肾藏精生髓，精足髓满则骨强，反之，肾气不足，气血运行无力，筋骨失养，骨枯髓减发为骨痿。《绝经后 OP（骨痿）中医药诊疗指南（2019 年版）》^[9] 将绝经后 OP 分为脾肾阳虚证、肝肾阴虚证、肾虚血瘀证，其中肝肾阴虚证以滋补肝肾，填精壮骨为治法，方选左归丸加减。Meta 分析发现左归丸治疗绝经后 OP 患者的疗效优于西医常规治疗^[10]，网络药理学分析左归丸治疗 OP，可能通过调控骨代谢平衡中成骨、破骨分化多个生物学过程发挥治疗作用^[11]。柴毅等^[12] 阐述了 Notch、MAPK、TGF- β 1/Smad、Wnt/ β -catenin 等信号途径参与了左归丸治疗 OP 的机制，表明左归丸治疗 OP 具有多靶点、多途径的干预特点。但关于中医药靶向性治疗 OP 的机制研究并不够深入，特别是有效基因的筛查及功能验证需要进一步的发掘。因此本研究采用 RNA-seq 筛选左归丸溶液促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖分化的有效基因，丰富了中医药靶向治疗 OP 的实验基础。

小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1 源自小鼠胚胎颅顶骨，具有定向分化为成骨细胞的特性。多篇文献描述大鼠体内给药制备左归丸含药血清干预细胞，发现左归丸含药血清能够促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖与分化^[13-15]。本实验采用 50% 乙醇溶液溶解左归丸，超声处理后获取左归丸溶液，发现不同浓度左归丸溶液能够促进 MC3T3-E1 细胞增殖分化，增强成骨标志基因（Runx2、Osx、Ocn、 β -catenin）表达，提高 ALP、ARS 阳性染色面积，其中以 400 μ g/mL 左归丸溶液干预效果最明显，当左归丸溶液干预浓度达到 1000 μ g/mL，MC3T3-E1 细胞成骨分化能力显著下降。因此，采用 400 μ g/mL 左归丸溶液处理 MC3T3-E1 细胞 48 h 后进行 RNA-seq 分析，发现 10 个表达差异最大的基因，其中

6 个上调基因和 4 个下调基因。为了进一步探明左归丸溶液促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞分化的药效物质基础，采用高效液相色谱仪检测发现左归丸样本中含有槲皮素，文献研究发现槲皮素可促进 MC3T3-E1 增殖和分化，且作用强度具有浓度相关性和时间相关性^[16]，充分证明了左归丸溶液促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞分化的药效成分。

对差异表达最大的 10 个基因进行 qPCR 验证，发现 EFCAB9、Foxj1、RasGRF1、GDF-9、Col4a3 可能为左归丸溶液治疗 OP 的靶标。EFCAB9 是 CatSper 通道中 Ca^{2+} 传感器，PH 依赖性调节细胞内 Ca^{2+} 浓度^[17]，在成骨细胞中可能通过 Ca^{2+} /CaMKII 信号通路促进成骨^[18]。Foxj1 是 Fox 家族的成员，在喉鳞状细胞癌中敲低后抑制糖酵解和 Wnt/ β -catenin 通路的激活^[19]，在斑马鱼 Kupffer 囊泡中 Wnt/ β -catenin 信号直接调控 Foxj1 的表达^[20]，说明 Foxj1 和 Wnt/ β -catenin 通路可能存在双向调节关系，具体调控关系还需要深入研究。RasGRF1 是一种父系印记基因，位于 Ras 蛋白的上游，参与调控细胞的生长、增殖、分化等生物学过程，与肿瘤细胞生物学行为关系密切^[21, 22]。GDF-9 为转化生长因子- β 超家族成员，能够启动始基卵泡的生长，刺激卵巢颗粒细胞增殖，对卵泡的形成、生长发育、排卵以及黄体功能起重要调节作用^[23, 24]。Col4a3 属于 IV 型胶原蛋白家族，分布于具有组织特异性的基底膜^[25]，能够抑制内皮细胞增殖和迁移，降低线粒体膜电位，诱导细胞凋亡，在鼻咽癌细胞抑制 Col4a3 表达显著促进细胞的侵袭与迁移^[26]。陈好远等^[27] 研究发现，左归丸含药血清能增强 MC3T3-E1 细胞 Cx43 mRNA、蛋白表达。本研究发现，左归丸溶液在促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖分化过程中上调 Efcab9、FOXJ1 mRNA 表达水平，下调 RasGRF1、GDF-9、Col4a3 mRNA 表达水平。以上说明左归丸促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞增殖分化具有多靶点特性。

综上所述，左归丸溶液（400 μ g/mL）在

MC3T3-E1 成骨细胞增殖分化过程中上调 Efcab9、FOXj1 mRNA 表达水平, 下调 RasGRF1、GDF-9、Col4a3 mRNA 表达水平, 揭示了左归丸治疗 OP 多靶点、多途径的分子机制。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 夏维波, 章振林, 林华, 等. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2017) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25 (3): 281-309.
- [2] 陈芳, 张宜, 徐立, 等. 中西医结合治疗绝经后骨质疏松症的研究进展 [J]. 医药导报, 2021, 40 (9): 1216-1220.
- [3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12 (4): 317-318.
- [4] Si L, Winzenberg TM, Jiang Q, et al. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010-2050 [J]. Osteoporos Int, 2015, 26 (7): 1929-1937.
- [5] 刘飞祥, 林子璇, 徐道明, 等. 左归丸防治骨质疏松症的动物模型和评价方法 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (18): 16-23.
- [6] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗骨质疏松症临床应用指南 (2021 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42 (4): 393-404.
- [7] 明·张介宾著. 景岳全书 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2021: 1298.
- [8] 牟宏亮, 吴小燕, 咎强, 等. 左归丸治疗骨质疏松症的临床应用及实验研究进展 [J]. 中医学报, 2021, 36 (4): 763-768.
- [9] 中华中医药学会. 绝经后骨质疏松症 (骨痿) 中医药诊疗指南 (2019 年版) [J]. 中医正骨, 2020, 32 (2): 1-13.
- [10] 刘硕, 赵希云, 卢增鹏, 等. 左归丸治疗绝经后骨质疏松症有效性的 Meta 分析 [J]. 中医临床研究, 2022, 14 (23): 143-148.
- [11] 黄胜男, 张颖, 王如然, 等. 左归丸治疗骨质疏松的网络药理学分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28 (2): 283-286.
- [12] 柴毅, 樊巧玲. 左归丸治疗骨质疏松症相关机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (17): 201-208.
- [13] 刘立萍, 任艳玲, 李然, 等. JNK 通路对左归丸含药血清调控 MC3T3 成骨细胞 Runx2 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (14): 143-146.
- [14] 刘立萍, 任艳玲, 李然, 等. 左归丸含药血清通过 p38 MAPK 信号通路诱导 MC3T3-E1 成骨细胞的分化 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33 (7): 1579-1581.
- [15] 陈好远, 桑红灵, 周安方, 等. 左归丸含药血清对 MC3T3-E1 细胞分化过程中 Cx43 表达及 GJIC 功能的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45 (1): 156-159, 221.
- [16] 牟丽秋, 杜俊, 胡旖耘, 等. 杜仲中槲皮素、京尼平苷及桃叶珊瑚苷对小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 增殖和分化的影响 [J]. 药物评价研究, 2015, 38 (2): 165-169.
- [17] Hwang JY, Mannowetz N, Zhang Y, et al. Dual sensing of physiologic pH and calcium by EFCAB9 regulates sperm motility [J]. Cell, 2019, 177 (6): 1480-1494.
- [18] Li J, Liu C, Li Y, et al. TMCO1-mediated Ca^{2+} leak underlies osteoblast functions via CaMKII signaling [J]. Nat Commun, 2019, 10 (1): 1589.
- [19] Liu L, Zhang P, Shao Y, et al. Knockdown of FOXJ1 inhibits the proliferation, migration, invasion, and glycolysis in laryngeal squamous cell carcinoma cells [J]. J Cell Biochem, 2019, 120 (9): 15874-15882.
- [20] Caron A, Xu X, Lin X. Wnt/ β -catenin signaling directly regulates Foxj1 expression and ciliogenesis in zebrafish Kupffer's vesicle [J]. Development, 2012, 139 (3): 514-524.
- [21] 王硕, 杨其贤, 殷旭薇, 等. RasGRF1 在结直肠癌细胞中的表达及其对癌细胞生物学行为的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32 (6): 44-48.
- [22] 钱伟明, 王海燕, 李可. 结肠癌组织 RASGRF1 蛋白表达与基因甲基化状态变化及其临床意义 [J]. 山东医药, 2019, 59 (19): 10-13.
- [23] 哈灵侠, 李向红. 多囊卵巢综合征患者卵泡液中 GDF9 和 BMP15 的表达及意义 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2014, 52 (10): 77-80, 95.
- [24] 徐清华, 程立立, 张敏, 等. 单卵母细胞对应的卵丘颗粒细胞中生长分化因子 -9 和骨形成蛋白 -15 的表达水平与胚胎发育潜能的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26 (9): 116-120.
- [25] 胡安邦, 李卫青, 洪国岱, 等. 血清 COL4A3 蛋白与非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者临床病理特征及预后相关性 [J]. 复旦学报 (医学版), 2019, 46 (5): 605-610.
- [26] Yang X, Wu Q, Wu F, et al. Differential expression of COL4A3 and collagen in upward and downward progressing types of nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncol Lett, 2021, 21 (3): 223.
- [27] 陈好远, 桑红灵, 周安方, 等. 左归丸含药血清对 MC3T3-E1 细胞分化过程中 Cx43 表达及 GJIC 功能的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45 (1): 156-159, 221.

(收稿: 2023-06-13 在线: 2023-12-05)

责任编辑: 汤 静