

# 梓醇促大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化的机制研究\*

傅淑平<sup>1△</sup>, 杨丽<sup>2</sup>, 龚理<sup>3</sup>, 李潇潇<sup>1</sup>, 袁璟<sup>1</sup>, 王军蒙<sup>1</sup>, 张荣华<sup>2△</sup>

(<sup>1</sup>南京中医药大学针药结合教育部重点实验室, 江苏 南京 210023; <sup>2</sup>暨南大学药学院中药教研室, 广东 广州 510632;

<sup>3</sup>新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

**[摘要]** 目的: 探讨梓醇促 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)骨向分化的作用机制。方法: (1)细胞分为对照组、成骨诱导组及梓醇组。4-氨基安替吡啉测酚法检测诱导第 7、14 和 21 天各组细胞上清碱性磷酸酶(ALP)活性, ALP 染色法检测诱导第 14 天各组细胞 ALP 阳性染色率, 茜素红染色法检测诱导第 21 天各组细胞矿化结节数; (2)运用 real-time PCR 法检测诱导第 7、14 和 21 天各组细胞中 Runx2、骨钙素(osteocalcin)、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)、Wnt3a、Wnt5a 及 Wnt11 的 mRNA 表达水平。结果: (1)2.0 mg/L 梓醇可增加 BMSCs 上清中 ALP 活性及细胞 ALP 的阳性染色率, 同时促进 BMSCs 矿化结节的形成( $P < 0.05$ )。 (2)梓醇促 BMSCs 骨向分化时, Runx2 的 mRNA 表达水平于第 14 天时达到峰值, 随后开始下降, 第 21 天时与对照组无统计学差异; osteocalcin 的 mRNA 相对表达量在第 7 天时高于对照组, 随后持续上升直至第 21 天。 (3)与对照组相比, 梓醇促 BMSCs 骨向分化时,  $\beta$ -catenin 与 Wnt3a 的 mRNA 相对表达量均于第 14 和 21 天时升高并维持在较高水平, 而 Wnt5a 及 Wnt11 的 mRNA 相对表达量在第 14 天达到峰值后开始下降, 第 21 天时 Wnt11 mRNA 相对表达量显著低于对照组。结论: 梓醇通过上调 Runx2 的表达, 促使 BMSCs 向成骨细胞方向分化, 同时还通过增加细胞 ALP 分泌及 osteocalcin 的表达, 促进细胞矿化的发生, 从而促使新生成骨细胞的成熟, 此作用可能与其有序激活 Wnt 信号通路相关。

**[关键词]** 梓醇; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; Runx2; 骨钙素; Wnt 信号通路

**[中图分类号]** R329.21; R285.5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.05.021

## Mechanisms of catalpol-induced osteogenic differentiation in SD rat bone marrow mesenchymal stem cells

FU Shu-ping<sup>1</sup>, YANG Li<sup>2</sup>, GONG Li<sup>3</sup>, LI Xiao-xiao<sup>1</sup>, YUAN Jing<sup>1</sup>, WANG Jun-meng<sup>1</sup>, ZHANG Rong-hua<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Acupuncture and Medicine Research of Minister of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; <sup>2</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; <sup>3</sup>The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China. E-mail: shupingfu@njucm.edu.cn; tzh@jnu.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the mechanisms for catalpol-induced osteogenic differentiation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **METHODS:** The cells were divided into control group, osteoinduction group and catalpol group. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was measured at 7 d, 14 d and 21 d after catalpol treatment, meanwhile ALP positive cell numbers and calcium nodes were counted at 14 d and 21 d after catalpol treatment, respectively. The mRNA expression of Runx2, osteocalcin, Wnt3a,  $\beta$ -catenin, Wnt5a and Wnt11 was detected at 7 d, 14 d and 21 d after catalpol treatment by real-time PCR. **RESULTS:** Catalpol at 2.0 mg/L increased ALP activity and ALP positive cell numbers significantly ( $P < 0.05$ ), meanwhile, it also increased calcium nodes numbers in cultured BMSCs ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, catalpol increased the mRNA expression of Runx2 significantly at 14 d, but not at the 7 d and 21 d. Catalpol also promoted the mRNA expression of osteocalcin significantly from 7 d to 21 d. Compared with control group, the mRNA expression of Wnt3a and  $\beta$ -catenin in catalpol group was increased at 14 d and 21 d. In addition, the mRNA expression of Wnt5a and Wnt11 in catalpol group was higher than that in control group at 14 d, but that

[收稿日期] 2018-07-10 [修回日期] 2018-09-31

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81774403; No. 81403479; No. 81473509); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20171492); 江苏省六大人才高峰项目 (No. YY-023); 江苏省第五期“333 高层次人才培养工程”

△通讯作者 傅淑平 Tel: 025-85811234; E-mail: shupingfu@njucm.edu.cn; 张荣华 Tel: 020-85228578; E-mail: tzh@jnu.edu.cn

was decreased at 21 d. **CONCLUSION:** Catalpol induces differentiation of BMSCs into osteoblast by increasing the mRNA expression of Runx2, and promotes the differentiation and mature of these osteoblasts by increasing ALP secretion, osteocalcin mRNA expression and calcium deposition. The activation of Wnt signaling pathway may be involved in this pro-osteogenic differentiation process.

[**KEY WORDS**] Catalpol; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Runx2; Osteocalcin; Wnt signaling pathway

梓醇(catalpol)是中国药典指定的地黄定性指标,属于环烯醚萜类化合物<sup>[1]</sup>。有研究显示地黄提取物能改善骨质疏松症中的骨代谢情况,提高成骨细胞的增殖及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,抑制破骨细胞的生成及溶骨活性<sup>[2]</sup>。本课题组前期研究也发现不同浓度梓醇有促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖及向成骨细胞方向分化的作用,且在促 BMSCs 增殖过程中,可同时激活经典及非经典 Wnt 信号通路<sup>[3-4]</sup>,但其促 BMSCs 骨向分化的作用机制并不明确。本实验在前期实验结果的基础上,结合大量研究所提示的 Wnt 信号通路是 BMSCs 骨向分化过程中的重要通路<sup>[5-6]</sup>这一线索,探讨梓醇促大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化的可能作用机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** SPF 级 3 月龄 SD 雌性大鼠,体重(200±5.0)g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。合格证号:SCXK(沪)2013-0016。

**1.2 实验药物** 梓醇标准品购于北京世纪奥科生物技术有限公司,用天平称取梓醇 1 mg,溶解于 10 mL DMEM 完全培养基中,0.22 μm 滤器过滤分装,配制成为 100 mg/L 的母液,在以后的实验中根据需要稀释。-20℃保存备用。

**1.3 主要试剂** 低糖 DMEM 培养基(Gibco); 优级胎牛血清(天津灏洋生物科技有限公司); 胰酶(Amresco); 地塞米松、β-糖蛋白(β-glycoprotein, β-GP)、维生素 C、EDTA、DMSO 及茜素红(Sigma); ALP 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); TRIzol(Invitrogen); RT-PCR 试剂盒(TaKaRa)。

**1.4 主要仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(ThermoForma); 超净工作台(苏州净化设备有限公司); 普通光学显微镜、倒置相差显微镜(Leica); Model 680 型酶标仪(Bio-Rad); Chromo 4 荧光定量 PCR 仪(MJ Research)。

### 2 实验方法

**2.1 梓醇促 BMSCs 骨向分化过程中对 ALP 活性的**

影响

**2.1.1 实验分组** 将细胞分为对照(control)组、成骨诱导(osteoiduction)组和梓醇组,对照组加入 DMEM 完全培养液,成骨诱导组加入经典骨向分化诱导液(含 10% 胎牛血清、10<sup>-8</sup> mol/L 地塞米松、50 mg/L VitC 和 10 mmol/L β-GP 的 DMEM 培养液),梓醇组加 2.0 mg/L 梓醇培养液进行培养。

**2.1.2 细胞上清液中 ALP 活性的检测** 取生长良好的 3 代或 4 代细胞,以 1×10<sup>8</sup>/L 接种于 24 孔板中,待细胞汇合达 80%~90%后,根据实验分组分别加入相应培养液进行培养,每 3 d 全量换液 1 次,于培养的第 7、14 和 21 天分别收集各实验组上清液,根据试剂盒操作说明进行 ALP 活性检测,每组各设 6 个复孔。以 ALP 活性为纵轴,天数为横轴,绘制 ALP 活性的变化曲线,ALP 活性用金氏单位表示,即 100 mL 血清在 37℃与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。计算公式如下:

$$\text{ALP 活性} = \frac{\text{测定管 A 值}}{\text{标准管 A 值}} \times \text{标准含酚的量} \times \frac{100 \text{ mL}}{0.05 \text{ mL}}$$

**2.1.3 ALP 染色阳性率的检测** 按 2.1.2 所述方法培养细胞,14 d 后消化各孔细胞,1 200 r/min 离心 5 min,去上清,加入 1 mL 普通培养液重悬细胞,接种于预先置有无菌盖玻片的 6 孔板中,充分贴壁 6 h,采用改良钙钴法对爬片细胞进行染色,随后于 100 倍镜下,随机选取不重复的 8 个视野,进行阳性细胞及总细胞数计数,计算 ALP 阳性染色率:ALP 阳性染色率(%)=(ALP 染色阳性细胞数/总细胞数)×100%。

**2.2 梓醇对 BMSCs 矿化能力的影响** 按 2.1.2 所述分组培养细胞,培养至第 21 天时,弃去培养液,进行茜素红染色,染色后,置 50 倍镜下观察各组细胞的矿化结节数,评价 BMSCs 的矿化能力。

**2.3 梓醇促 BMSCs 骨向分化过程中对 BMSCs 成骨基因及 Wnt 基因表达的影响** 按 2.1.2 所述分组培养细胞,分别在培养后的第 7、14 和 21 天用 TRIzol 提取细胞的总 RNA,然后根据 real-time PCR 试剂盒

操作步骤说明,逆转录 RNA 后进行 PCR 扩增,检测各实验组细胞中 Runx2、骨钙素 (osteocalcin)、Wnt3a、Wnt5a、Wnt11 及  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 的 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak) 法计算成骨诱导组、梓醇组

中靶基因相对于对照组增加或减少的倍数,评价梓醇对目的基因 mRNA 表达水平的影响。引物序列详见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物信息表

Table 1. The sequences of the primers for real-time PCR

Name	Sequence	GC (%)	Tm (°C)	Product length (bp)
Runx2	F:5' -TTCGTCAGCGTCTATCAGTTC-3'	50	61.7	150
	R:5' -CTTCCATCAGCGTCAACACC -3'	55	61.7	
Osteocalcin	F:5' -GGTGCAGACTAGCAGACACCA -3'	59.1	63.8	173
	R:5' -AGGTAGCGCCGGAGTCTATTCA-3'	54.6	61.94	
GAPDH	F:5' -GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG -3'	54.5	64.42	143
	R:5' -ATGCTGCTGAAGACGCCAGTA -3'	52.4	62.81	
Wnt3a	F:5' -TGTTTTCCACTGGTGTGTTATG-3'	43.5	62.18	105
	R:5' -AATGAACCCTGCTCCCTCTGT -3'	52.4	62.3	
Wnt5a	F:5' -CGACGCTTCGCTTGGATTG -3'	57.9	64.23	172
	R:5' -AATGTGGCCAAAGCCATTAGGA-3'	45.5	64.79	
$\beta$ -catenin	F:5' -AACGGCTTTCGGTTGAGCTG -3'	55	64.85	118
	R:5' -TGGCGATATCCAAGGGCTTC -3'	55	64.47	
Wnt11	F:5' -TCTGCATGAAGAATGAGAAGGTG-3'	43.5	61.67	129
	R:5' -CTCTGTCCGTGTAGGGGTTGTAG-3'	56.5	62.16	

R:forward; R:reverse.

### 3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示,各时点的组间数据比较采用单因素方差分析,若方差齐,则选用 Bonferroni 法进行组间比较;若方差不齐,则选用 Tamhane 法进行组间比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 梓醇对细胞上清液中 ALP 活性及 ALP 染色阳性率的影响

采用单因素方差分析比较各实验组不同诱导时点 ALP 的活性,结果显示:第 7 天时,成骨诱导组和梓醇组 ALP 活性均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),且梓醇组低于成骨诱导组 ( $P < 0.05$ )。第 14 天时,成骨诱导组与对照组比较无统计学意义,且此 2 组 ALP 活性均低于梓醇组 ( $P < 0.05$ )。第 21 天时,梓醇组及成骨诱导组均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),但前两者之间比较,其 ALP 活性无差异,见表 2。ALP 染色阳性率统计结果显示,第 14 天时,梓醇组及成骨诱导组的 ALP 染色阳性率均大于对照组 ( $P < 0.05$ ),梓醇组与成骨诱导组无差别,见图 1。

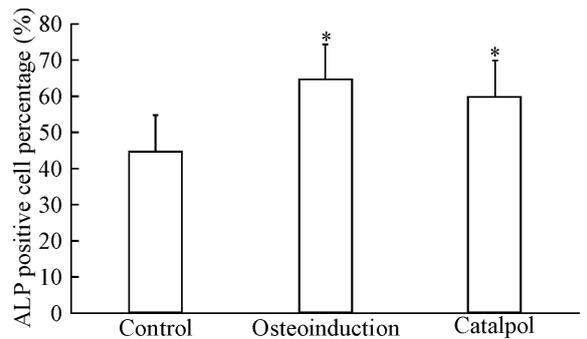


Figure 1. The effect of catalpol on ALP positive cell percentage of BMSCs. Mean  $\pm$  SD.  $n = 8$  \*  $P < 0.05$  vs control group.

图 1 梓醇对 BMSCs 中 ALP 染色阳性率的影响

表 2 梓醇对 ALP 活性的影响

Table 2. The effect of catalpol on ALP activity (Mean  $\pm$  SD.  $n = 6$ )

Group	Time (d)		
	7	14	21
Control	4.110 $\pm$ 0.237	7.110 $\pm$ 0.737	6.680 $\pm$ 0.483
Osteoinduction	7.470 $\pm$ 0.132*	8.090 $\pm$ 0.671	8.280 $\pm$ 0.541*
Catalpol	6.130 $\pm$ 0.415**	8.970 $\pm$ 0.369**	8.860 $\pm$ 0.251*

\*  $P < 0.05$  vs control group; \*\*  $P < 0.05$  vs osteoinduction group.

## 2 梓醇对 BMSCs 矿化能力的影响

干预 21 d 后,各实验组均有矿化结节形成,茜素红染色法对其进行染色计数后,采用单因素方差分析比较各实验组中 BMSCs 矿化结节数,结果显示,梓醇组及成骨诱导组的矿化结节数均大于对照组 ( $P < 0.05$ ),且梓醇组与成骨诱导组无显著差别,见图 2。

## 3 梓醇促 BMSCs 骨向分化中对 Runx2 和 osteocalcin 表达的影响

Real-time PCR 结果显示:第 7 天时,成骨诱导组 Runx2 mRNA 表达量显著高于对照组与梓醇组 ( $P < 0.05$ ),而后两组之间无统计学意义;第 14 天时,梓醇组 Runx2 mRNA 相对表达量高于对照组,但小于成骨诱导组 ( $P < 0.05$ );第 21 天时,对照组、梓醇组及成骨诱导组之间比较均无统计学意义;各组间 osteocalcin mRNA 相对表达量的比较结果显示:在第

7、14 及 21 天 3 个时点,梓醇组、成骨诱导组均高于对照组,且梓醇组各时点均低于成骨诱导组 ( $P < 0.05$ ),见图 3。

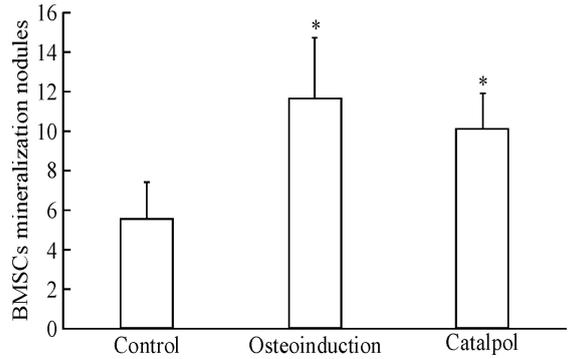


Figure 2. The effect of catalpol on mineralization in BMSCs. Mean ± SD.  $n = 8$  \*  $P < 0.05$  vs control group.

图 2 梓醇对 BMSCs 矿化能力的影响

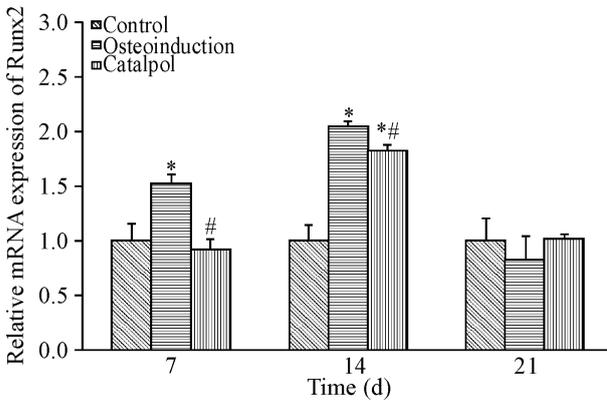


Figure 3. The effect of catalpol on the mRNA expression of Runx2 and osteocalcin in BMSCs. Mean ± SD.  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs osteoinduction group.

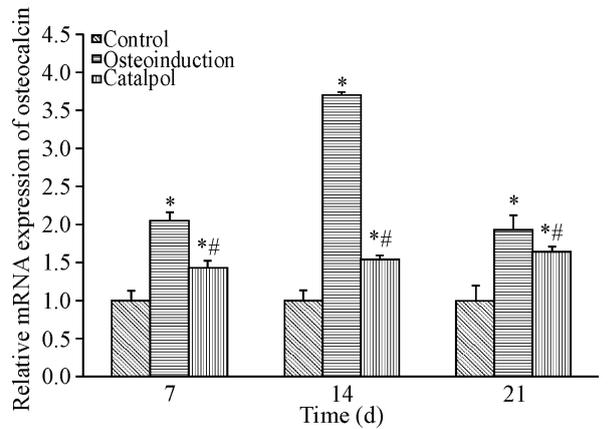
图 3 梓醇对 Runx2 及 osteocalcin mRNA 表达的影响

## 4 梓醇促 BMSCs 骨向分化中对 $\beta$ -catenin 和 Wnt3a mRNA 表达的影响

Real-time PCR 结果显示:第 7 天时,各实验组  $\beta$ -catenin mRNA 表达量无统计学意义;第 14、21 天时,成骨诱导组和梓醇组均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),其中第 14 天时,梓醇组  $\beta$ -catenin mRNA 表达量低于成骨诱导组 ( $P < 0.05$ ),第 21 天时,两组之间的差异无统计学意义。各组间 Wnt3a mRNA 相对表达量的比较结果显示:第 7 天时,各实验组 Wnt3a mRNA 表达量无统计学意义;第 14 和 21 天时,成骨诱导组和梓醇组均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),且梓醇组各时点均低于成骨诱导组 ( $P < 0.05$ ),见图 4。

## 5 梓醇促 BMSCs 骨向分化中对 Wnt5a 和 Wnt11 mRNA 表达的影响

Real-time PCR 结果显示:第 7 天时,梓醇组



Wnt5a mRNA 表达量高于对照组与成骨诱导组 ( $P < 0.05$ ),而后两者之间的差异无统计学意义;第 14 天时,成骨诱导组和梓醇组均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),且梓醇组 Wnt5a mRNA 表达量低于成骨诱导组 ( $P < 0.05$ );第 21 天时,成骨诱导组和梓醇组均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),但前两组之间的差异无统计学意义。各组间 Wnt11 相对表达量的比较结果显示:第 7 天时,各实验组 Wnt11 mRNA 相对表达量无统计学意义;第 14 天时,成骨诱导组低于对照组 ( $P < 0.05$ ),梓醇组高于对照组和成骨诱导组 ( $P < 0.05$ );第 21 天时,梓醇组与成骨诱导组均低于对照组 ( $P < 0.05$ ),见图 5。

## 讨 论

有研究显示,在胚胎骨发育期的 BMSCs 凝集阶

段, *Runx2* 表达缺失将造成无成骨细胞发生; *Runx2*

基因敲除纯合子小鼠完全缺乏骨组织, 不仅无骨基

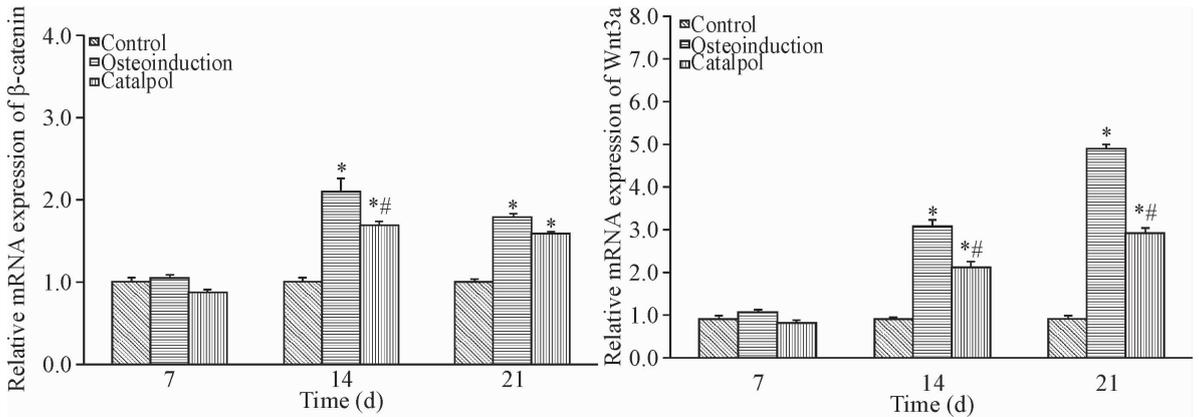


Figure 4. The effect of catalpol on the mRNA expression of  $\beta$ -catenin and Wnt3a in BMSCs. Mean  $\pm$  SD.  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs osteoinduction group.

图4 梓醇对  $\beta$ -catenin 和 Wnt3a mRNA 表达的影响

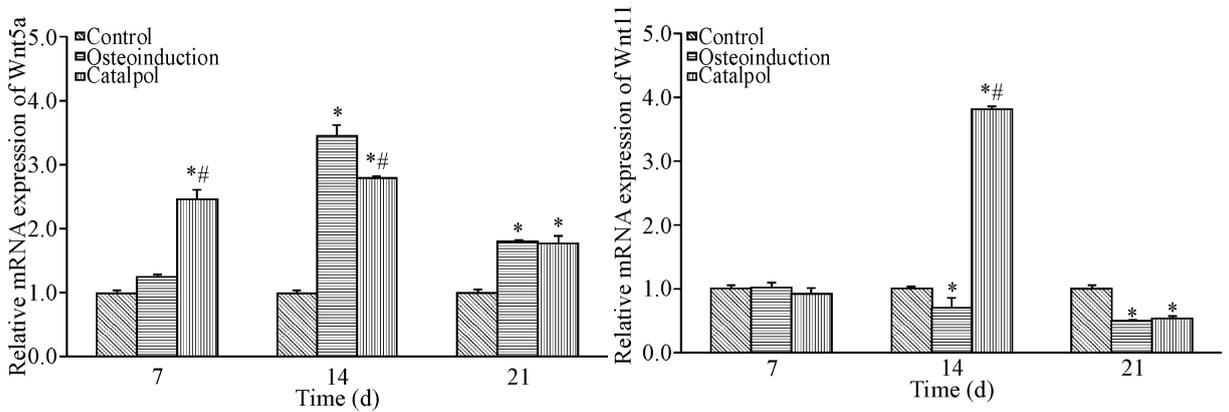


Figure 5. The effect of catalpol on the mRNA expression of Wnt5a and Wnt11 in BMSCs. Mean  $\pm$  SD.  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs osteoinduction group.

图5 梓醇对 Wnt5a 和 Wnt11 mRNA 表达的影响

质和成骨细胞, 而且也无髓腔形成; 在 BMSCs 向成骨细胞转化的过程中, 出现 *Runx2* 表达后, 才启动细胞分化“开关”, 促使 BMSCs 发育为成骨细胞或成软骨细胞, 因此 *Runx2* 被认为是 BMSCs 向成骨细胞系分化的关键调控因子, 是骨形成过程中最早和最具特异性的标志<sup>[7-9]</sup>。Osteocalcin, 即骨  $\gamma$ -羧基谷氨酸蛋白, 是一种仅由成骨细胞和成牙骨质细胞合成的 VitK 依赖酶修饰的非胶原蛋白, 主要沉积在骨组织的细胞外间质, 一般在钙化早期开始表达, 钙结节成熟后达高峰, 是成骨细胞分化成熟和进入矿化期的主要指征之一<sup>[10]</sup>。

本课题组在前期研究中, 通过检测不同浓度梓醇对 BMSCs 细胞增殖及骨向分化的影响时, 发现梓醇促 BMSCs 增殖及骨向分化的最佳浓度分别为 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L, 且经典与非经典 Wnt 信号通路的激活参与了梓醇促 BMSCs 增殖的过程<sup>[3-4]</sup>, 但其

促 BMSCs 骨向分化的具体作用机制却并不明确。为探讨梓醇促 BMSCs 骨向分化的可能机制, 本研究在验证梓醇可增加 BMSCs ALP 活性, 促进 BMSCs 矿化的基础上, 观察梓醇对骨向分化关键因子 *Runx2* 及 osteocalcin 表达情况的影响, 结果显示: 成骨诱导组 BMSCs 从第 7 天开始, 其 *Runx2* 与 osteocalcin 表达量就明显高于对照组, 且均在第 14 天时达到峰值; 随后开始下降, 第 21 天时 osteocalcin 表达量仍高于对照组, 但 *Runx2* 与对照组无差异。梓醇促 BMSCs 骨向分化过程中, *Runx2* mRNA 表达水平也是第 14 天时达到峰值, 随后开始下降, 第 21 天时与对照组无统计学差异; osteocalcin mRNA 相对表达量在第 7 天时就高于对照组, 随后持续上升直至第 21 天。梓醇组中 *Runx2* mRNA 表达量在第 7 和 14 天时均低于成骨诱导组, 第 21 天时两者无差异; 但梓醇组中 osteocalcin mRNA 表达量在 3 个时点均低于成骨诱导

组。这些结果说明梓醇培养液可通过上调 Runx2 和 osteocalcin 表达,促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化,增加细胞钙沉积,促进成骨作用的形成,但其作用强度低于化学诱导剂;体外培养的 BMSCs 可自动向成骨细胞方向分化,因此培养至一定时间后骨向分化标志因子 Runx2 的表达不会再因诱导剂的作用而持续增加,此结果与课题组前期研究结果相似<sup>[11]</sup>。

自从最初报道低密度脂蛋白相关蛋白 5 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5, LRP5) 变异可引发常染色体退行性病骨质疏松假性神经胶质瘤综合征,使患者骨量下降、骨折风险增加以及骨骼畸形后<sup>[12]</sup>,越来越多的研究证实 Wnt 信号的经典与非经典通路在 BMSCs 骨向分化过程中具有重要的作用。Gong 等<sup>[13]</sup>发现 Wnt1、Wnt2 和 Wnt3a 通过与其受体 LRP5 作用,增加  $\beta$ -catenin 在核内的积累,诱发 ALP 活性增加,参与骨向分化;保守型活化的  $\beta$ -catenin 转染亦可提高 ALP 活性。去除内源性 LRP 抑制因子 Dickkopf 和 sclerostin,可增强体内 Wnt 信号的功能,提高  $\beta$ -catenin 累积量,刺激骨的形成<sup>[14-15]</sup>;当小鼠体内缺乏可溶性 Wnt 蛋白抑制剂分泌型卷曲相关蛋白 1 时,其成骨细胞及骨细胞的凋亡明显下降,且从这种小鼠骨髓中分离培养的间充质干细胞,其凋亡明显降低的同时,其骨向分化能力、增殖能力却明显得到提高<sup>[16-17]</sup>。Bennett<sup>[18]</sup>、Jackson 等<sup>[19]</sup>则发现 LiCl 可以阻断糖原合成酶激酶-3 $\beta$  酶活性,刺激 BMSCs 骨向分化,Wnt3a、Wnt1、Wnt10b、保守型活化的  $\beta$ -catenin 均可以活化 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路刺激成骨细胞的形成,而这一通路的抑制因子 Dickkopf 蛋白 1 则可减少成骨细胞的形成,提示内源性 Wnt 信号通路在成骨细胞的形成及骨形成中具有重要的作用。此外,Gaur 等<sup>[20]</sup>还发现 Runx2 是 Wnt/ $\beta$ -catenin/转录因子 1 (transcription factor 1, TCF1) 信号的一个靶点,经典 Wnt 信号通路可通过直接活化 Runx2 基因的表达而增强 BMSCs 的骨向分化能力。此外,Boland 等<sup>[21]</sup>发现,Wnt11 在 BMSCs 骨向分化时表达上调;而 Wnt5a 对骨的形成有促进的作用。Boyan 等<sup>[6]</sup>则发现,Wnt11 为 Wnt5a 上游基因,可通过上调 Wnt5a 的表达,促进 MSCs 向成骨细胞方向分化,这些都提示我们经典和非经典 Wnt 信号通路参与调节 BMSCs 骨向分化过程。本研究通过检测不同干预时点 BMSCs 中 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、Wnt5a 及 Wnt11 mRNA 情况,探讨梓醇促 BMSCs 骨向分化过程中对经典及非经典 Wnt 信号通路相关因子的影响。结果表明,在经典骨向分化诱导液与

梓醇培养液干预下, BMSCs 内 Wnt3a 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达量在第 14 和 21 天时均显著提高,但梓醇组中 Wnt3a 表达量在这 2 个时点均低于成骨诱导组, $\beta$ -catenin 表达量在第 14 天时低于成骨诱导组,第 21 天时,两者之间无差异。说明梓醇及骨向分化诱导液在诱导 BMSCs 向成骨细胞方向分化的过程中激活了 Wnt 经典信号通路。此外,本实验结果还显示:梓醇组中 BMSCs 内 Wnt5a mRNA 表达量在第 7 天时就高于对照组,并在整个培养周期内均处于高表达状态;成骨诱导组在第 7 天时与对照组无差异,第 14 天时达到高峰,且高于梓醇组,随后开始下降,至第 21 天时与梓醇组处于同一水平。就 Wnt11 相对表达量而言,第 7 天时,各实验组之间无差异;第 14 天时梓醇组中 Wnt11 相对表达量显著上升,高于对照组;而成骨诱导组则显著下降,低于对照组;至 21 天时,梓醇组 Wnt11 表达量快速下降,与成骨诱导组持平,且均低于对照组。从这个结果中,我们看到经典骨向分化诱导液在促 BMSCs 骨向分化过程中并未提高 Wnt11 的表达;梓醇在第 14 天时表现出显著提高 BMSCs Wnt11 表达量的作用,且这一作用持续时间并不长,在第 21 天时又低于对照组。结合相关文献报到所指出的 Wnt11 表达的上升可能主要出现在 BMSCs 骨向分化的早期或中期,在细胞进入矿化后,其表达量下降<sup>[21]</sup>这一提示,以及本研究中所观测到的成骨诱导组在第 7 天时,Runx2 基因相对表达量就已高于对照组,我们推测经典成骨诱导液促 BMSCs 向成骨方向分化的诱发时点可能早于第 7 天,因此错过了其 Wnt11 相对表达量的高峰期。此外,在第 21 天时成骨诱导组、梓醇组细胞 Wnt11 表达量均低于对照组的现象,可能是由于 BMSCs 在体外自然培养过程中,细胞缓慢地向成骨细胞方向分化,Wnt11 表达逐步提升,而成骨诱导组、梓醇组的细胞均已处于矿化期,Wnt11 表达量下降所致,由此也提示我们 Wnt11 表达量的上升应该主要是在 BMSCs 骨向分化早中期。

综上所述,我们认为梓醇通过上调 Runx2 和 osteocalcin 的表达,同时增加 ALP 的分泌沉积,促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化及新生成骨细胞的成熟,此作用可能与其同时激活经典与非经典 Wnt 信号通路相关,但其具体作用途径有待进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000:94.
- [2] Oh KO, Kim SW, Kim JY, et al. Effect of Rehmannia

- glutinosa Libosch extracts on bone metabolism [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 334(1-2):185-195.
- [3] 傅淑平, 张荣华. 不同浓度梓醇对SD大鼠骨髓间充质干细胞增殖及骨向分化的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(10):2398-2400.
- [4] 傅淑平, 杨丽, 洪浩, 等. 梓醇促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖过程中Wnt信号通路的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(9):1656-1660.
- [5] Kim JA, Choi HK, Kim TM, et al. Regulation of mesenchymal stromal cells through fine tuning of canonical Wnt signaling[J]. *Stem Cell Res*, 2015, 14(3):356-368.
- [6] Boyan BD, Olivares-Navarrete R, Berger MB, et al. Role of Wnt11 during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on microstructured titanium surfaces [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):8588.
- [7] Shablott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cell from cultured human primordial germ cell [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 95(23):13721-13726.
- [8] Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, et al. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1 deficient mice [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(4):467-481.
- [9] Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, et al. Multilineage differentiation of cbfa1-deficient calvarial cells *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(2):630-636.
- [10] Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 294(2):458-468.
- [11] 傅淑平, 杨丽, 洪浩, 等. 淫羊藿苷促SD大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(7):839-846.
- [12] Gong Y, Vikkula M, Boon L, et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13 [J]. *Am J Hum Genet*, 1996, 59(1):146-151.
- [13] Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development [J]. *Cell*, 2001, 107(4):513-523.
- [14] Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5 [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(20):1513-1521.
- [15] Li X, Zhang Y, Kang H, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20):19883-19887.
- [16] Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(5):1222-1237.
- [17] Almeida M, Han L, Bellido T, et al. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and-independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(50):41324-41351.
- [18] Bennett CN, Longo KA, Wright WS, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(9):3324-3329.
- [19] Jackson A, Vayssière B, Garcia T, et al. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells [J]. *Bone*, 2005, 36(4):585-598.
- [20] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, et al. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating *Runx2* gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39):33132-33140.
- [21] Boland GM, Perkins G, Hall DJ, et al. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93(6):1210-1230.

(责任编辑: 卢萍, 余小慧)