

益骨汤含药血清通过经典 Wnt 信号通路促进成骨细胞增殖分化的研究

何帮剑¹, 朱胤晟¹, 应建伟¹, 李桂锦¹, 吕一¹, 姚新苗¹, 童培建²

1. 浙江中医药大学附属第三医院骨伤科, 浙江 杭州 310005

2. 浙江中医药大学附属第一医院骨伤科, 浙江 杭州 310006

[摘要] 目的: 在经典 wnt 信号通路抑制剂大鼠 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1) 的干预下, 观察益骨汤含药血清对成骨细胞的经典 Wnt 信号通路的影响, 探究益骨汤治疗骨质疏松的作用机制, 为临床使用补肾活血中药防治骨质疏松症提供实验依据。方法: 将 40 只雌性 SD 大鼠随机分成 2 组, 益骨汤水提液组和空白对照组, 连续灌胃 10 天, 获取含药血清。从乳鼠颅盖骨中分离培养成骨细胞, 实验分为 4 组, 即 A 组 (益骨汤含药血清组)、B 组 (DKK1 组)、C 组 (DKK1+益骨汤含药血清组)、D 组 (空白血清对照组)。进行细胞增殖 MTT 检测、碱性磷酸酶活性检测, RT-PCR 检测经典 Wnt/ β -catenin 通路中 β -链蛋白 (β -catenin)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP-5)、DKK1 基因的表达情况。结果: 根据 MTT 法动态观察各组成骨细胞增殖, 发现成骨细胞增殖呈规律性: 48 h 至 72 h 成骨细胞呈对数增长期, 96 h 后细胞增殖逐渐受到抑制。同一时间点与 B 组比较, A、C、D 各组成骨细胞的增殖和 ALP 活性显著较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。同一时间点与 D 组比较, A 组成骨细胞的增殖和 ALP 活性显著较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 B 组比较, A、C、D 组 β -catenin mRNA、LRP-5 mRNA、TCF mRNA 的表达均明显升高, DKK1 mRNA 的表达明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 D 组比较, A 组 β -catenin mRNA、LRP-5 mRNA、TCF mRNA 的表达均明显升高, DKK1 mRNA 的表达明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 益骨汤含药血清可能是通过抑制 DKK1 的高表达, 从而上调经典 Wnt/ β -catenin 信号中 β -catenin、LRP-5、TCF 基因的表达, 达到促进成骨细胞增殖, 起到抗骨质疏松作用。

[关键词] 绝经后骨质疏松症; 益骨汤; 成骨细胞; 经典 Wnt/ β -catenin 信号通路; 大鼠 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1); β -链蛋白 (β -catenin); 低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP-5); 细胞实验

[中图分类号] R589.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 03-0010-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.03.003

Yigu Tang Containing Medicated Serum Promoting the Proliferation and Differentiation of Osteoblast Through Classic Wnt Signaling Pathway

HE Bangjian, ZHU Yinsheng, YING Jianwei, LI Guijin, LV Yi, YAO Xinmiao, TONG Peijian

Abstract: Objective: From the intervention of classic Wnt signaling pathway inhibitor Dickkopf associated protein 1 (DKK1), to observe the effect of Yigu tang containing medicated serum on canonical Wnt signaling pathway, and to discuss the mechanism of Yigu tang for osteoporosis, so as to provide experimental basis for the clinical application of kidney-nourishing and blood-activating Chinese medicine for osteoporosis. Methods: Divided 40 female SD rats into Yigu tang extract group and blank control group randomly. Both groups were administrated by gavage for 10 days successively, and medicated serum was obtained. Osteoblasts were isolated and cultured from calvaria bones of neonatal rats. The experiment was carried out in four groups: group A (Yigu tang containing medicated serum group), group B (DKK1 group), group C (DKK1 and Yigu tang containing medicated serum group), group D (blank serum control group). MTT assay of cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity assay were carried out. The expression of β -catenin, low density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP-5) and DKK1 gene in classic Wnt/ β -catenin signaling pathway were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: According to MTT assay, observed the proliferation of

[收稿日期] 2016-09-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81273771); 姚新苗名老中医专家传承工作室建设项目 (GZS2012015); 浙江省中医药重点学科 (中医老年骨伤学) 建设资助项目 (2012-XK-A17)

[作者简介] 何帮剑 (1982-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 骨质疏松症基础与临床研究。

osteoblasts in all groups dynamically, and discovered the proliferation of osteoblasts exhibiting regularity: from 48h to 72h, osteoblasts showed logarithmic growth phase, and the proliferation was inhibited gradually after 96h. Comparing with those in group B at the same time point, the proliferation of osteoblasts and ALP activity in group A, C and D were obviously higher ($P < 0.05$). Comparing with those in group D at the same time point, the proliferation of osteoblasts and ALP activity in group A were evidently higher ($P < 0.05$). Comparing with those in group B, the expression of β -catenin mRNA, LRP-5 mRNA and TCF mRNA in group A, C and D were increased significantly, while the expression of DKK1 mRNA was decreased obviously ($P < 0.05$). Comparing with those in group D, in group A, the expression of β -catenin mRNA, LRP-5 mRNA and TCF mRNA were raised evidently, while the expression of DKK1 mRNA was reduced significantly ($P < 0.05$). Conclusion: Yigu tang containing medicated serum may increase the expression of β -catenin mRNA, LRP-5 mRNA and TCF mRNA in classic Wnt/ β -catenin signaling pathway by inhibiting the high expression of DKK1, in order to promote the proliferation of osteoblasts and achieve the effect of anti-osteoporosis.

Keywords: Postmenopausal osteoporosis; Yigu tang; Osteoblasts; Classic Wnt/ β -catenin signaling pathway; Dickkopf associated protein 1(DKK1); β -catenin; Low density lipoprotein receptor related protein 5(LRP-5); Cell experiment

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal osteoporosis, PMOP)是一种由于妇女绝经后发生的骨代谢紊乱疾病,主要表现为骨量降低,骨微结构破坏,骨脆性增加,易发生骨折,PMOP及其伴发的骨质疏松性骨折已成为危害绝经后妇女健康及影响生活质量的社会问题。因此研究其发病机制及治疗方法一直是广大医务工作者的研究热点。我们的前期研究发现,益骨汤能促进成骨细胞增殖、分化,并对绝经后骨质疏松症有一定的治疗作用,但其促进成骨细胞增殖、分化的机制尚未完全阐明^[1-3]。有研究发现经典 wnt 信号通路与成骨细胞增殖及骨质疏松症的发生密切相关^[4]。本研究旨在通过经典 wnt 信号通路抑制剂 DKK1 干预下探讨益骨汤含药血清体外促进成骨细胞增殖分化的作用机制,为临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 采用 SPF 级 12 周龄雌性 SD 大鼠 40 只,体重(200±10)g,用于含药血清的制备;新生 SD(24 h 以内)乳鼠 20 只,用于成骨细胞的分离培养,由浙江中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(沪)20080016。动物实验经浙江中医药大学动物实验中心伦理委员会审批通过。

1.2 实验药物 ①益骨汤水提液:由浙江中医药大学中药标准化研究实验室完成,处方:补骨脂 10 g,骨碎补、生地黄、淫羊藿、山药各 15 g,丹参 30 g,配制浓度为 2.0 g 生药/mL,冰箱保存备用。②大鼠 Dickkopf 相关蛋白 1(DKK1):美国 R&D Systems 公司制造。

1.3 含药血清制备 ①将 40 只雌性 SD 大鼠随机分成 2 组,益骨汤水提液组和空白对照组,给药剂量均按人日用临床剂量,经人一大鼠体表面积比值折算成相当于人临床给药剂量,以每 100 g 大鼠灌胃 2 mL 给药,空白对照组则给予等剂量生理盐水,每天 1 次,连续灌胃 10 天。②动物处死前 2 h 再灌胃 1 次,腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉,腹腔静脉抽血,于 4℃ 静置 4 h,用低温离心机 3 000 r/min,离心

30 min,分离血清。取血清在 56℃ 水浴灭活 30 min,然后用 0.22 μ m 滤膜过滤 1 次,分装,-20℃ 保存备用。使用前用 DMEM 培养基稀释成 10% 含药血清。空白血清对照组按以上程序,所取血清即空白对照组血清。

1.4 成骨细胞分离、培养、鉴定 取 24 h 内的乳鼠浸泡在 75% 的酒精 5 min,无菌取颅骨置于含有 D-hanks 液的直径为 5 cm 的培养皿中,剔除脂肪组织及残留血,再次用 D-hanks 液冲洗后剪成约 1 mm³,用 0.2% 的 I 型胶原酶和 0.25% 的胰蛋白酶各 1 mL 混合,在 37℃ 的水浴中消化 10 min 后加 D-hanks 液,吹打均匀后 1 400 r/min 离心 10 min,去除上清液,用 10% 胎牛血清 3 mL 吹打均匀后接种到培养瓶中,置 5% CO₂、37℃ 培养箱中孵育,24 h 换液,隔 48 h 换液 1 次,及时传代,指标检测均用第三代细胞,成骨细胞鉴定取第 3 代细胞进行检测,采用倒置相差显微镜观察成骨细胞的形态特征。

1.5 分组及含药血清添加 实验分为 4 组,即 A 组(益骨汤含药血清组)、B 组(DKK1 组)、C 组(DKK1+ 益骨汤含药血清组)、D 组(空白血清对照组),取第 3 代成骨细胞,经 0.25% 胰酶消化,将细胞悬液以终浓度 2×10^4 个/mL 接种到 24 孔培养板中,24 h 细胞贴壁后,A 组加入浓度为 10% 的益骨汤含药血清,B 组加入 0.2 μ g/mL DKK1,C 组加入浓度为 10% 的益骨汤含药血清和 0.2 μ g/mL DKK1,D 组加入空白血清,以后每隔 3 天换液 1 次。

1.6 成骨细胞增殖测定 (MTT 法) 根据 MTT 法动态观察各组 48 h、72 h、96 h 成骨细胞生长增殖情况。使用与酶标仪匹配的 96 孔培养板,每孔接种浓度为 2×10^4 个/mL,每孔 200 μ L,设置 6 个复孔,胎牛血清培养 24 h 后,吸除培养基,根据分组分别加入益骨汤含药血清、含 DKK1 血清、DKK1+ 益骨汤含药血清及空白血清各 200 μ L。继续培养后每孔加 20 μ L 的 MTT(用 PBS 配成 5 mg/mL 原液,过滤除菌后,原液

与 DMEM 以 1 : 9 配比, 混合均匀后使用), 继续在 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 4 h 后吸去培养液加入 150 μL DMSO, 充分震荡后, 于酶标仪上测定波长 570 nm 处的吸光度(OD) 值。

1.7 碱性磷酸酶活性测定 分别取培养 3、6、9、12、18 天的 4 组培养细胞的培养液, 2 500 r/min, 离心 10 min, 取上清液进行测定。取上清液 30 μL 按照碱性磷酸酶(AKP)测试盒操作表进行碱性磷酸酶活性测定, 得空白孔吸光度、标准孔吸光度、测定孔吸光度, 结果计算如下: 碱性磷酸酶(金氏单位/100 mL)=(测定 OD 值 - 空白 OD 值)/(标准 OD 值 - 空白 OD 值)× 酚标准品浓度× 100 mL。

1.8 RT-PCR 法测定经典 Wnt 信号通路关键基因的表达 上海生工生物技术服务有限公司合成引物序列, 引物序列分别是: β - catenin F : 5' - CTGACCAAAGTCTAAATGACG - 3', β - catenin R : 5' - CTGAACAAGAGTCCCAAGGAG - 3'; LRP - 5 F : 5' - GGCTCGGATGAAGCTAACTG - 3', LRP - 5 R : 5' - CAGGATGATGCCAATGACAG - 3'; TCF F 5' - AAGCAGCAA CAGATGATTGAAAA - 3', TCF R : 5' - CAATCCGAGCCTGG ACCTT - 3'; DKK1 F 5' - TGTTACTGTGGGAAGGTCTG - 3', DKK1 R : 5' - GCTGTTGGTTTTAGTGTCTCTGG - 3'。细胞融合度为 90~100%时, 取出无菌室, 去其上清, 用 PBS 洗 2 次后, 采用 Trizol 法提取 RNA。PCR 反应体系包括双蒸水(ddH₂O)8.2 μL、2× SYBR Premix Ex Taq 10 μL、上游引物(10 pmol/μL)0.4 μL、下游引物(10 pmol/μL)0.4 μL、cDNA 1 μL, 94℃ 预变性 1 min。循环参数为 94℃ 变性 20 sec, 55℃ 退火 20 sec, 72℃ 延伸 20 sec, 读板; 共循环 40 次; 最后融解曲线。得到每个样品的 Ct 值, 以空白对照组为对照, 以 GAPDH 为内参基因, 计算每个样品目的基因的相对表达量 2^{-ΔΔCt}。

1.9 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料比较用单因素方差分析, 计数资料的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 成骨细胞的形态学观察 见图 1。在倒置显微镜下可见部分细胞贴壁、伸展, 呈纺锤形、梭形、多角形, 有方向的平行排列, 并可重叠生长, 胞浆丰富向外伸展, 单核, 核大而清晰, 呈圆形或卵圆形, 含 1~2 个核仁。



图 1 体外培养 72 小时后的成骨细胞 (×100)

2.2 各组成骨细胞增殖比较 见表 1。根据 MTT 法动态观察各组成骨细胞增殖, 发现成骨细胞增殖呈规律性: 48 h 至 72 h 成骨细胞呈对数增长期, 96 h 后细胞增殖逐渐受到抑制。同一时间点与 B 组比较, A、C、D 各组成骨细胞的增殖显著较高, 差异均有统计学意义(P<0.05)。同一时间点与 D 组比较, A 组成骨细胞的增殖显著较高, 差异有统计学意义(P<0.05)。

表 1 各组成骨细胞增殖比较($\bar{x} \pm s$)

分组	48 h	72 h	96 h
A组	0.364± 0.025 ^{①②}	0.741± 0.050 ^{①②}	0.699± 0.015 ^{①②}
B组	0.303± 0.017	0.554± 0.033	0.485± 0.032
C组	0.333± 0.035 ^①	0.650± 0.121 ^①	0.592± 0.038 ^①
D组	0.331± 0.026 ^①	0.644± 0.060 ^①	0.599± 0.079 ^①

同一时间点与 B 组比较, ①P<0.05; 同一时间点与 D 组比较, ②P<0.05

2.3 各组成骨细胞 ALP 活性检测比较 见表 2。同一时间点与 B 组比较, A、C、D 各组成骨细胞的 ALP 活性显著较高, 差异均有统计学意义(P<0.05)。同一时间点与 D 组比较, A 组成骨细胞的 ALP 活性显著较高, 差异有统计学意义(P<0.05)。

表 2 各组成骨细胞 ALP 活性检测比较($\bar{x} \pm s$)

分组	3天	6天	9天	12天	18天
A组	0.652± 0.043 ^②	0.745± 0.027 ^②	0.848± 0.029 ^②	0.947± 0.051 ^②	0.796± 0.045 ^②
B组	0.556± 0.049	0.612± 0.039	0.709± 0.028	0.843± 0.035	0.739± 0.052
C组	0.611± 0.072 ^①	0.684± 0.071 ^①	0.799± 0.028 ^①	0.899± 0.034 ^①	0.756± 0.026 ^①
D组	0.608± 0.062 ^①	0.683± 0.042 ^①	0.792± 0.049 ^①	0.894± 0.029 ^①	0.756± 0.039 ^①

同一时间点与 B 组比较, ①P<0.05; 同一时间点与 D 组比较, ②P<0.05

2.4 各组成骨细胞 β-catenin mRNA、LRP-5 mRNA、TCF mRNA、DKK1 mRNA 表达比较 见表 3。与 B 组比较, A、C、D 组 β - catenin mRNA、LRP - 5 mRNA、TCF mRNA 的表达均明显升高, DKK1 mRNA 的表达明显降低, 差异均有统计学意义(P<0.05)。与 D 组比较, A 组 β - catenin mRNA、LRP - 5 mRNA、TCF mRNA 的表达均明显升高, DKK1 mRNA 的表达明显降低, 差异均有统计学意义(P<0.05)。

表 3 各组成骨细胞 β-catenin mRNA、LRP-5 mRNA、TCF mRNA、DKK1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

分组	β - catenin	LRP - 5	TCF	DKK1
A组	1.132± 0.064 ^②	1.145± 0.057 ^②	1.328± 0.059 ^②	0.381± 0.046 ^②
B组	0.453± 0.047	0.514± 0.049	0.319± 0.035	1.343± 0.058
C组	0.678± 0.062 ^①	0.714± 0.061 ^①	0.849± 0.068 ^①	1.122± 0.042 ^①
D组	0.912± 0.057 ^①	0.985± 0.052 ^①	0.982± 0.059 ^①	0.996± 0.079 ^①

与 B 组比较, ①P<0.05; 与 D 组比较, ②P<0.05

3 讨论

益骨汤是姚新苗教授根据补肾活血法拟定的治疗骨质疏松的经验方,方由补骨脂、骨碎补、生地黄、淫羊藿、山药、丹参等六味中药配伍而成。方中以补骨脂、骨碎补、淫羊藿为君药,取其补肾生精助阳之功,精髓生,肾阳足,骨髓生化有源,则筋骨强壮;以生地黄、山药、丹参为臣药,生地黄、山药健脾养阴生津,后天之本充盈,则气血生化有源,运化无穷;丹参活血祛瘀止痛,推动全身气血循环。如此配伍,则内外兼顾,标本共治,诸药合用,共收补肾壮骨、健脾益气、活血化瘀之功,成为治疗骨质疏松之良方。我们的前期研究发现益骨汤能有效的促进成骨细胞的增殖分化;提高血清 BGP、血清 Ca 水平;改善骨生物力学性能;促进成骨细胞 BMP 的表达,从而提高对骨吸收的抑制作用,达到防治骨质疏松的目的^[1-3]。

近年来研究发现经典 wnt 信号通路与成骨细胞增殖分化有密切关系,是治疗骨质疏松症的潜在靶点^[4]。经典 Wnt/ β -catenin 通路的调控主要围绕 LRP5 和 β -catenin 这两个关键因子进行, β -catenin 是经典 Wnt 通路中的核心调控因子,其表达水平决定着通路的开放与否。将向成骨细胞分化的 BMSCs 选择性敲除 β -catenin 基因,导致异位软骨细胞发生,正常成骨细胞受抑制^[5]。LRP-5 作为 Wnt 信号转导的跨膜受体是骨量形成的重要调节因子,LRP5 基因缺失会导致成骨细胞的增殖、功能和存活受到影响^[6]。Qiu 等发现人 LRP-5 激活型突变导致高骨量表型,骨组织活检示骨小梁增多,骨髓内脂肪减少,而 LRP-5 失活性突变导致骨质疏松^[8]。DKK1 是经典 Wnt 信号通路的抑制剂,能特异性的抑制经典 Wnt/ β -catenin 信号通路,其机理为通过影响 LRP-5 和 β -catenin 使得 Wnt 受体复合物脱离,阻止该通路的下行,从而影响下游基因的表达,进而影响成骨细胞^[9]。许兵等研究发现补肾活血中药能促进成骨细胞增殖,并推测其可能与激活经典 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,但其并未阐明其具体的作用靶点^[10]。本研究发现益骨汤含药血清能够有效地促进成骨细胞体外增殖分化及提高 ALP 表达,文献报道 ALP 的高表达是成骨细胞分化的特异性标志,是最常见的评价骨形成的指标。同时我们还发现 DKK1 能抑制成骨细胞增殖分化,益骨汤+DKK1 组成骨细胞增殖明显优于 DKK1 组,表明益骨汤对成骨细胞的增殖作用与 DKK1 有关,且可能是抑制 DKK1 的表达来实现的。进一步通过荧光定量 RT-PCR 检测经典 Wnt/ β -catenin 信号通路关键基因的表达,我们发现益骨汤含药血清组和 DKK1+ 益骨汤含药血清组的 β -catenin mRNA、LRP-5 mRNA、TCF mRNA 的表达均明显高于 DKK1 组,DKK1 mRNA 的表达明显低于 DKK1 组,由此推测益骨汤含药血清可能是通过抑制 DKK1 的高表达,从而上调经典 Wnt/ β -catenin 信号中 β -catenin、LRP-5、TCF 基因的表达,从而达到促进成骨细胞增殖的作用。

总之,本实验研究发现益骨汤含药血清能促进成骨细胞增殖分化,DKK1 表达增高抑制了成骨细胞的增殖,因此益骨汤促成骨细胞增殖分化的机制可能是通过抑制 DKK1 的高表达,从而上调经典 Wnt/ β -catenin 信号中 β -catenin、LRP-5、TCF 基因的表达,达到促进成骨细胞增殖,起到抗骨质疏松作用。

[参考文献]

- [1] 姚新苗,杨林,王靖,等. 益骨汤对去势大鼠血清激素水平、骨密度和骨生物力学影响的实验研究[J]. 中医正骨, 2006, 18(1): 3-4.
- [2] 姚新苗,冷涛,张云鹏. 益骨口服液含药血清对成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(1): 6-8.
- [3] 姚新苗,朱胤晟,平佃辉,等. 益骨口服液对去势大鼠骨质疏松症外周血清炎症因子的影响[J]. 中医正骨, 2012, 24(11): 7-10.
- [4] 刘艳玲,李方兵,赵曦. Wnt 信号通路在成骨细胞中的作用:成骨还是破骨? [J]. 中国组织工程研究, 2014, 33(18): 5366-5371.
- [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] Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, et al. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism[J]. Bone, 2012, 50(2): 477-489.
- [7] Lara-Castillo N, Johnson ML. LRP receptor family member associated bone disease [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2015, 16(2): 141-148.
- [8] Qiu w, Chen L, Kassem M. Activation of non-canonical Wnt/JNK pathway by Wnt3a is associated with differentiation fate determination of human bone marrow stromal(mesenchymal) stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 413(1): 98-104.
- [9] Cao Z, Liu R, Zhang H, et al. Osterix controls cementoblast differentiation through downregulation of Wnt- signaling via enhancing DKK1 expression[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(3): 335-344.
- [10] 许兵,金红婷,王萧枫,等. 补肾活血含药血清对成骨细胞经典 Wnt/ β -catenin 通路的影响研究[J]. 中国骨伤, 2015, 28(6): 553-558.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)