

· 基础研究 ·

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

许兵¹, 金红婷², 王萧枫¹, 肖鲁伟², 童培建^{2,3}

(1. 浙江中医药大学附属温州中西医结合医院骨科, 浙江 温州 325000; 2. 浙江省骨伤研究所, 浙江 杭州 310053; 3. 浙江省中医院骨伤科, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的: 通过观察补肾活血含药血清对成骨细胞的经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响, 探究补肾活血颗粒防治骨质疏松症(osteoporosis, OP)的作用机制。方法: 将 20 只健康 SD 雌性大鼠随机分为补肾活血组和生理盐水组, 每组 10 只, 分别给予补肾活血溶液和生理盐水进行灌胃 1 周, 按照药物含药血清制备方法得到补肾活血含药血清和生理盐水含药血清。采用体外分离乳鼠颅骨按照酶消化培养细胞, 通过瑞氏-姬姆萨(R-J)染色观察细胞形态及碱性磷酸酶(ALP)染色进行成骨细胞的鉴定, 鉴定成功后取第 3 代成骨细胞分为生理盐水含药血清组、正常培养组及补肾活血含药血清组, 加入含 15% 相应的含药血清的培养基培养后检测成骨细胞的 ALP 含量及增殖率, 观察各组的矿化结节的情况, 采用 RT-PCR 检测 β -catenin、Runx2、Osx mRNA 的表达。结果: 培养的细胞经过瑞氏-姬姆萨染色显示胞浆有蓝色颗粒, 细胞核呈紫褐色, 有的可见 1~3 个核仁, 呈现传代后的成骨细胞的形态, 且 ALP 染色可见胞浆内含紫红色颗粒, 表明培养的细胞是成骨细胞。补肾活血含药血清组细胞的 ALP 含量为(6.272±0.131)金氏单位/100 ml, 增殖率为(0.81±0.172)%, 与生理盐水含药血清组比较能够明显增强成骨细胞的增殖分化活性($P<0.01$); 补肾活血含药血清组细胞经过茜素红染色可见 4 个不同大小的橘红色结节, 最大 1.0 cm×1.0 cm, 能够明显的促进成骨细胞的矿化功能; RT-PCR 检测发现 β -catenin、Runx2 及 Osx mRNA 表达量分别为 (1.782±0.944)、(1.935±0.994)、(1.610±0.811), 与生理盐水组比较有明显的提高($P<0.01$), 但与正常培养组比较无明显差异($P>0.05$)。结论: 补肾活血含药血清能够明显促进成骨细胞的增殖及矿化功能, 并且推测激活经典 Wnt/ β -catenin 信号通路可能是补肾活血颗粒防治骨质疏松症的作用机制。

【关键词】 成骨细胞; 血清; 中草药

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.06.017

Effects of serum of Bushen Huoxue prescription (补肾活血方) on classic Wnt/ β -catenin signaling pathways of osteoblasts XU Bing, JIN Hong-ting, WANG Xiao-feng, XIAO Lu-wei, and TONG Pei-jian*. Zhejiang of Fractures Research Institute, Hangzhou 310053, Zhejiang, China; Zhejiang Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe effects of serum Bushen Huoxue prescription (补肾活血方) on classic Wnt/ β -catenin signaling pathways of osteoblasts, and explore mechanism of Bushen Huoxue prescription (补肾活血方) for preventing osteoporosis. **Methods:** Twenty health female rats were randomly divided into two groups, including Bushen Huoxue (补肾活血方) group and saline group, 10 in each group. Bushen Huoxue (补肾活血方) group and Saline group were gavaged Bushen Huoxue and saline every day for 1 week. Bushenhuoxue containing serum and saline containing serum were got according to methods of serum preparation of drug-containing. The osteoblasts was cultured with neonatal rat skull according to Enzyme Consumer Law, and was identified by Wright-Giemsa staining (R-J) and alkaline phosphatase staining (ALP). The third generation of osteoblasts was divided into three groups, including saline group, normal group, Bushen Huoxue (补肾活血方) group. Each group were added to 15% appropriate medium. ALP activity of osteoblasts and osteoblasts proliferation rate were tested, mineralized nodules were observed, the expression of β -catenin, Runx2, Osx mRNA of osteoblasts were tested by RT-PCR. **Results:** There was blue granules in cytoplasm, cell nucleus was flint with 1 to 3 nucleoli showed by R-J staining, morphology of osteoblasts were cultured. ALP staining showed cytoplasm with purple granules, the results showed that the cultured cell was osteoblasts. The content of ALP in Bushen Huoxue (补肾活血方) group was (6.272±0.131), appreciation rate was (0.81±

基金项目: 卫生部科学研究基金(省部共建项目计划)(编号:WKJ2008-2-032); 浙江省优秀青年人才基金项目(编号:2014ZQ025); 浙江省科技厅实验动物计划(编号:2012C37087)

Fund program: Supported by Scientific Research Fund of Ministry of Public Health (No.WKJ2008-2-31)

通讯作者: 童培建 E-mail: johonmark@163.com

Corresponding author: TONG Pei-jian E-mail: johonmark@163.com

0.172), and could significantly improve differentiation and proliferation activity of osteoblasts compared with Saline group ($P < 0.01$). There were four different size orange nodules, the Maximum nodule was 1.0×1.0 cm in *Bushen Huoxue* (补肾活血方) group after Alizarin red staining, the results showed *Bushen Huoxue* (补肾活血方) group could obviously improve mineralization of osteoblasts. The expression of mRNA of β -catenin, Runx2 and Osx in *Bushen Huoxue* (补肾活血方) group were (1.782±0.944), (1.935±0.994) and (1.610±0.811) by RT-PCR, it was significantly increased compared with saline group ($P < 0.01$), but there was no difference between *Bushen Huoxue* (补肾活血方) group and normal group ($P > 0.05$). **Conclusion:** *Bushen Huoxue* (补肾活血方) group could obviously promote differentiation, proliferation and mineralization of osteoblasts through activation of Wnt, β -catenin signaling pathway. It suggested that the mechanism of action of *Bushen Huoxue* (补肾活血方) particle could prevent osteoporosis through the activation of Wnt, β -catenin signaling pathway.

KEYWORDS Osteoblasts; Serum; Drugs, Chinese herbal

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(6):553-558 www.zggszz.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是老年人常见的代谢性骨病,正常骨量的维持是依靠成骨细胞与破骨细胞的偶联机制完成,其中参与骨重建的成骨细胞是骨的形成、骨骼发育与生长的重要细胞,主要负责骨基质的合成、分泌和矿化,是骨代谢过程的主要功能细胞^[1]。近年来研究经典 Wnt/ β -catenin 信号通路对成骨细胞的影响成为热点,并且发现补肾活血中药能够促进成骨细胞的增殖及功能活性,但其具体机制并不清楚。本实验通过研究补肾活血含药血清对成骨细胞的经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响来阐述其对成骨细胞的影响及补肾活血颗粒防治骨质疏松症的机制,为临床应用补肾活血颗粒提供理论依据及实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及试剂

倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),高速离心机(德国 Eppendorf),CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo),旋转式恒温振荡仪(江苏培英实验设备有限公司),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),液氮生物容器(四川亚西橡胶型机器有限公司),定量 PCR 仪器(美国 ABI 公司);补肾活血颗粒(由本校药学院制备提供,有熟地、山药、杜仲、附子、山茱萸、枸杞、红花、甘草、肉桂、桃仁共 10 味),PBS(杭州吉诺),1640 培养液(含青链霉素)(杭州吉诺),胎牛血清(杭州四季青),胰蛋白酶-EDTA 消化液(杭州吉诺),I 型胶原(美国 Sigma 公司),瑞氏-姬姆萨染液(杭州吉诺),ALP(碱性磷酸酶)染色试剂盒(南京建成科技有限公司),ALP 测定试剂盒(南京建成科技有限公司),MTT 测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司),茜红素染色试剂盒(美国 Sigma 公司),反转录试剂盒(TAKARA, DRR037, 大连),PCR 引物(杭州荧光泰生物技术有限公司设计),定量试剂盒(TAKARA, DRR041, 大连)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物 健康 SD 大鼠 20 只雌性,体重

(200±20) g; 实验动物许可证号:SYXK(浙)2008-0115);3 d 乳鼠 1 只[体重 50 g,实验动物许可证号:SYXK(浙)2008-0115]。

1.2.2 补肾活血含药血清的制备 将熟地、山药、杜仲、附子、山茱萸、枸杞、红花、甘草 8 味药物饮片浸泡 1 h,加入 12 倍量水回流提取 3 次,每次 1.5 h;提取液减压浓缩至相对密度为 1.05,再加入 95%乙醇使含醇量为 60%,沉淀 24 h,回收乙醇。将肉桂、桃仁 2 味药物饮片以 10 倍 60%乙醇量浸泡 1 h,提取 3 次,每次 1.5 h;减压回收乙醇,合并水提取与醇提取药液,减压浓缩至 2 g 生药/ml,-20℃保存备用^[2]。取健康雌性 SD 大鼠 20 只,随机分为补肾活血组和生理盐水组,每组 10 只,其中补肾活血组按照每 100 g 灌胃 2 ml 计算给药浓度后每日给予补肾活血溶液进行灌胃,生理盐水组按照同样给药浓度每日给予生理盐水进行灌胃,连续给药 1 周,末次给药后 2 h 摘眼球取血,分离得到补肾活血含药血清和生理盐水含药血清,均过滤除菌后分装冻存(2 ml/支,-80℃)备用^[3]。

1.2.3 成骨细胞的培养 取 1 只 3 d 乳鼠处死放于 75%乙醇中 2 min,放入无菌操作箱在无菌条件下取出颅盖骨,于培养皿用 PBS 液漂洗多次,剪成大小约 1 mm×1 mm,置于离心管中加入 5 ml 0.25%胰蛋白酶放入 37℃恒温水浴中 20 min,弃上清消化液,加入 5 ml I 型胶原酶,放入 75 r/min 37℃恒温振荡仪中震荡 1 h,取上清消化液,1 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入已配好的细胞培养液(85% 1640 培养液+15%胎牛血清)制成细胞悬液;剩余骨片重复加入 5 ml I 型胶原酶,重复前面操作,二者细胞悬液混合吹打均匀,计数后按 2×10⁵ 接种于培养板中,37℃、5%CO₂ 饱和湿度下培养,每 3 天换液 1 次^[3]。待细胞增殖至占据瓶底约 80%表面时,用 0.25%胰蛋白酶消化,以 1:2 比例传代至 12 孔板,并加培养液依上法继续培养,传至第 3 代细胞,采用 ALP 染色及瑞氏-姬姆萨染液观察细胞形态进行成

骨细胞的鉴定;鉴定培养的成骨细胞后分成 3 组,分别为补肾活血含药血清组、生理盐水含药血清组和正常培养基组,每组分别加入含 15% 补肾活血含药血清、15% 生理盐水含药血清和 15% 胎牛血清的培养基,并且在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行培养 24 h 后进行实验。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 成骨细胞的鉴定 从镜下观察原代细胞、传代后的细胞及瑞氏-姬姆萨染色(按照说明书)的细胞形态,并取第 3 代贴壁细胞吸去上清培养液,用 PBS 漂洗 1~2 次,固定液固定 3 min 左右,然后滴加新鲜配制的底物应用液盖满细胞,加盖疏水膜,放置湿盒中避光 37 ℃、5% CO₂ 孵育 15 min,水洗(疏水膜会遇水掉下),趁湿用复染液染 3 min 左右,水洗,镜下观察 ALP 染色结果。

1.3.2 成骨细胞的 ALP 含量、增殖率测定及矿化结节染色 各组细胞分别按照 ALP 试剂盒、MTT 试剂盒、茜素红染色试剂盒的说明书进行操作和计算。ALP 含量测定在酶标仪上按 520 nm 检测 ALP 的吸光度,经公式 ALP(金氏单位/100 ml)=(测定管吸光度/标准管吸光度)×标准管含酚的量×(100 ml/0.05 ml)换算得到 ALP 含量(重复 5 孔)。细胞增殖率在 570 nm 测定 OD 吸光度,经过公式(OD 实验-OD 本底)/(OD 对照-OD 本底)×100%换算得到细胞增殖率(重复 5 孔)。并在镜下观察各组细胞矿化结节染色情况。

1.3.3 RT-PCR 检测成骨细胞中 β-catenin、Runx2、Osx 的 mRNA 的表达量 杭州荧光泰生物技术有限公司设计引物序列(表 1)。从培养的成骨细胞中提取 RNA,按照 TAKARART 试剂盒操作合成 cDNA,并按照 PCR 反应体系(表 2)及反应条件:94 ℃ 5 min,再将反应条件变为 94 ℃、15 s,60 ℃、50 s,循环扩增 40 次,以 β-actin 作为内参照,与目的产物进行比较进行相对定量,60 ℃ 检测荧光值得到 CT 值(重复 6 次),根据 2^{-ΔΔct} 方法计算获得相对定量结果^[4]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,3 组的 ALP 含量、细胞增殖率、β-catenin、Runx2、Osx mRNA 的表达量均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐性用 LSD 法,不齐用 Dunnett's T3 法。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 荧光定量 PCR 所测基因的引物序列

Tab.1 Primer sequences of genes measured by quantitative PCR

| 基因名称 | 引物序列 | 产物长度(bp) |
|-----------|---------------------------------|----------|
| β-catenin | 上游 5'-TGCTGGGCTGCAGAAAATGGTT-3' | 207 |
| | 下游 5'-ACGATGGCCGGCTTGTTC-3' | |
| Runx2 | 上游 5'-CTACGAAATGCCTCTGCTGT-3' | 188 |
| | 下游 5'-GCTTCTGCTGTGCCTTCTTG-3' | |
| Osx | 上游 5'-CCACCCATTGCCAGTAATCT-3' | 199 |
| | 下游 5'-TTCTTTGTGCCTCTTTTCC-3' | |
| β-actin | 上游 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3' | 246 |
| | 下游 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3' | |

表 2 PCR 反应体系

Tab.2 Reaction system of PCR

| PCR 成分 | 体积(μl) |
|--------------------------|--------|
| 2×SYBR | 12.5 |
| 上下游引物各(10 μM) | 0.5 |
| cDNA 模板 | 2.0 |
| ddH ₂ O 补充体积至 | 25 |

2 结果

2.1 成骨细胞的鉴定

倒置显微镜下观察原代和传代后的细胞及瑞氏-姬姆萨染色的细胞发现:大量原代细胞贴壁生长,为长梭形或 2~3 个突起,胞质透亮、饱满,部分区域出现重叠生长或辐射生长的现象(图 1);传代后的细胞形态以不规则形、长梭形、三角形为主,有较多突起,单核呈卵圆形,1~3 个核仁,胞质丰富、清晰相邻细胞彼此贴靠,边界难以分清,并成铺路石样(图 2);经过瑞氏-姬姆萨染色结果显示细胞的胞浆有蓝色颗粒,细胞核呈紫褐色,有的可见 1~3 个核仁,并且外观形态呈现传代后的成骨细胞的形态(图 3);而经过 ALP 染色可以发现细胞的胞浆内含

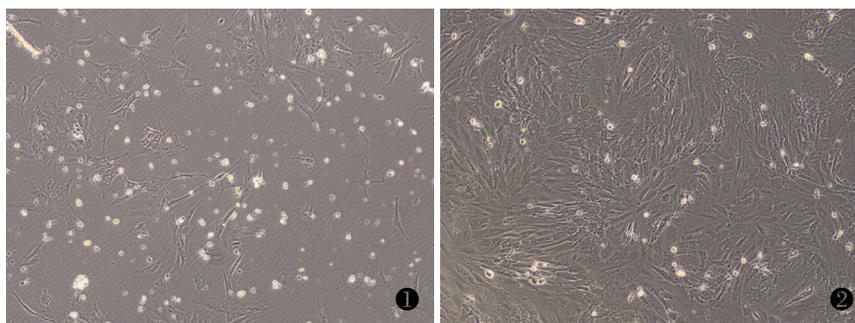


图 1 传代 2 d 后的贴壁原代成骨细胞(×100) 图 2 传代 1 d 后的贴壁成骨细胞(×100)

Fig.1 Adherent primary osteoblasts after 2 days Fig.2 Adherent primary osteoblasts passaged for 1 day

紫红色颗粒,呈现出成骨细胞的阳性反应(图 4),这些都是成骨细胞的特征。

2.2 成骨细胞的 ALP 含量及增殖率

补肾活血含药血清及正常培养基组的成骨细胞 ALP 含量均高于生理盐水含药血清组 ($P<0.01$),但补肾活血含药血清组的成骨细胞 ALP 含量低于正常培养基组 ($P<0.01$);补肾活血含药血清组成骨细胞的增殖率(0.810 ± 0.172)明显高于生理盐水含药血清组(0.383 ± 0.164), ($P<0.01$),但补肾活血含药血清组成骨细胞的增殖率低于正常培养基组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 矿化结节染色

各组细胞在连续培养 18 d 后进行茜素红染色发现:3 组细胞均有被染为橘红色的矿化结节形成,其中补肾活血含药血清组细胞矿化结节数量明显多于生理盐水含药血清组,体积略有增大,并且补肾活血含药血清组细胞矿化结节数量与正常培养基组细胞基本相等,但是体积略有偏小(图 5-7)。

2.4 成骨细胞的 β -catenin、Runx2、Osx mRNA 的 RT-PCR 检测结果

补肾活血含药血清组细胞的 β -catenin、Runx2

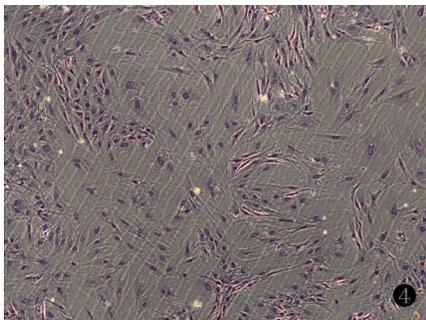
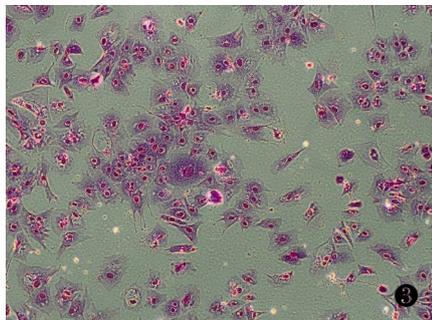


图 3 瑞氏-姬姆萨染色成骨细胞的形态 ($\times 100$) 图 4 ALP 染色的成骨细胞的阳性反应 ($\times 100$)

Fig.3 Morphology of osteoblasts after Wright-Giemsa staining Fig.4 Positive reaction of osteoblasts after ALP staining

表 3 成骨细胞的 ALP 活性检测及增殖率 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.3 Detection of activity and proliferation rate of osteoblasts ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 样本量 | ALP (金氏单位/100 ml) | 增殖率 (%) |
|--------|-----|-------------------------|-------------------------------------|
| 生理盐水组 | 5 | 3.177 9 \pm 0.103 6 | 0.383 4 \pm 0.164 2 |
| 正常培养基组 | 5 | 8.315 0 \pm 0.279 6* | 1.000 0 \pm 1.000 0 [#] |
| 补肾活血组 | 5 | 6.271 8 \pm 0.131 4** | 0.810 0 \pm 0.172 4 ^{##} |
| F 值 | | 964.143 | 26.382 |
| P 值 | | <0.01 | <0.01 |

注:与生理盐水组比较, * $P=0.000$, ** $P=0.000$, # $P=0.000$, ## $P=0.000$ 。*与**比较, $P=0.000$, #与##比较, $P=0.049$

Note: Compared with saline group, * $P=0.000$, ** $P=0.000$, # $P=0.000$, ## $P=0.000$. Compared with normal group, ** $P=0.000$, ## $P=0.049$. *vs**, $P=0.000$, #vs##, $P=0.049$

及 Osx mRNA 表达与生理盐水含药血清组比较均具有明显的提高 ($P<0.01$), 与正常培养基组比较略有增加, 但没有明显的差异 ($P>0.05$)。见表 4。

3 讨论

中医认为,骨质疏松属于“骨萎”“骨痹”范畴,以肾精亏虚为本,以瘀血阻络为标,年老肾衰,肾中精气不足,无以生髓养骨而致骨痿软乏力,加之老年人气虚不能推动血液正常流通,日久则致瘀,瘀阻经络,经络不通则出现疼痛、功能障碍,血瘀又可致气血运行障碍,营养物质不能濡养脏腑,引起肝脾肾俱虚而加重骨质疏松的症状。骨质疏松症是成骨细胞和破骨细胞的偶联平衡被破坏造成的骨代谢性疾病关键,其中成骨细胞起着主要的作用^[4]。现代临床与实验研究发现补肾活血中药既能促进成骨细

表 4 成骨细胞的 β -catenin、Runx2 及 Osx 的 RT-PCR 检测结果 ($\bar{x}\pm s, 2^{-\Delta\Delta CT}$)
Tab.4 RT-PCR test results of β -catenin、Runx2 and Osx of osteoblasts ($\bar{x}\pm s, 2^{-\Delta\Delta CT}$)

| 组别 | 样本量 | β -catenin | Runx2 | Osx |
|--------|-----|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 生理盐水组 | 6 | 0.2103 \pm 0.0853 | 0.2691 \pm 0.1975 | 0.2155 \pm 0.1412 |
| 正常培养基组 | 6 | 1.1056 \pm 0.6512* | 1.1058 \pm 0.4859 [#] | 1.1949 \pm 0.692 [△] |
| 补肾活血组 | 6 | 1.7816 \pm 0.9439** | 1.9351 \pm 0.9936 ^{##} | 1.6104 \pm 0.8112 ^{△△} |
| F 值 | - | 8.457 | 7.080 | 6.923 |
| P 值 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与生理盐水组比较, * $P=0.034$, ** $P=0.001$, # $P=0.047$, ## $P=0.002$, $\Delta P=0.022$, $\Delta\Delta P=0.003$ 。*与**比较, $P=0.098$, #与##比较, $P=0.134$, Δ 与 $\Delta\Delta$ 比较, $P=0.297$

Note: Compared with saline containing serum group, * $P=0.034$, ** $P=0.001$, # $P=0.047$, ## $P=0.002$, $\Delta P=0.022$, $\Delta\Delta P=0.003$. *vs**, $P=0.098$, #vs##, $P=0.134$, Δ vs $\Delta\Delta$, $P=0.297$

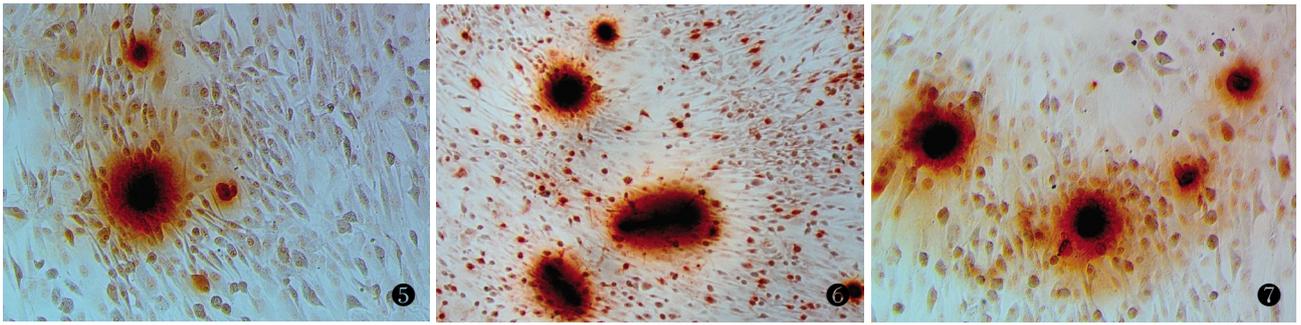


图 5 生理盐水含药血清组(茜素红染色 $\times 100$),可见 2 个不同大小的橘红色结节,最大 1.0 cm \times 1.0 cm 图 6 正常培养基组茜素红染色($\times 100$),可见 5 个不同大小的橘红色结节,最大 2.0 cm \times 1.0 cm 图 7 补肾活血含药血清组(茜素红染色 $\times 100$),可见 4 个不同大小的橘红色结节最大 1.0 cm \times 1.0 cm

Fig.5 Saline group (Alizarin red staining $\times 100$), there were two orange nodules with different sizes, the maximum nodule was 1.0 \times 1.0 cm Fig.6 Normal group (Alizarin red staining $\times 100$), there were five orange nodules with different sizes, the maximum nodule was 2.0 \times 1.0 cm Fig.7 Bushen Huoxue (补肾活血方) group (Alizarin red staining $\times 100$), there were four orange nodules with different sizes, the maximum nodule was 1.0 cm \times 1.0 cm

胞的分化增值,又能够促进骨形成,达到协同作用^[5-7]。但是对于补肾活血中药防治骨质疏松症的具体作用机制研究较少。

3.1 补肾活血含药血清对成骨细胞的影响

体外培养的成骨细胞具有与体内成骨细胞基本相同的生物特性,能很好的体现成骨细胞的功能活动特点,是研究骨代谢疾病的主要手段。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^[8]。本实验采用乳鼠的颅盖骨进行酶消化培养成骨细胞^[9],通过显微镜下观察细胞的形态及瑞氏-姬姆萨染色后的细胞形态,并通过 ALP 染色观察发现不管是原代细胞还是传代后的细胞均呈现出成骨细胞的形态特点,并且有成骨细胞的阳性反应,说明本实验体外培养的就是成骨细胞。实验中进一步对各组含药血清对成骨细胞的 ALP、增殖及矿化结节观察发现补肾活血组含药血清能明显的促进成骨细胞的分化增值,并且 ALP 含量明显增加,表明补肾活血含药血清能够明显促进成骨细胞的分化增值及 ALP 的分泌,并促进骨形成和骨矿化。

3.2 补肾活血含药血清对成骨细胞经典 Wnt/ β -catenin 通路的影响

成骨细胞与破骨细胞的藕联机制失衡是导致骨代谢疾病骨质疏松症发生的关键,现代研究成骨细胞中经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用与骨质疏松症的发生越来越受到关注,成为近年来的研究热点。当成骨细胞外 Wnt 因子与膜受体卷曲蛋白(Frizzled)结合后,通过一系列胞膜及胞质蛋白的相互作用形成二聚体,使 β -catenin 在胞质内累积,然后进入细胞核内与 T 细胞转录因子(T-cell-specific transcription factor,TCF)/淋巴增强因子(lymphoid

enhancing factor,LEF)共同结合形成复合聚体,激活下游基因 Runx2,促使 Osx 基因启动靶基因的转录,促进成骨细胞分化增值而其作用,这就是经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路。该通路通过对成骨细胞作用达到对骨质疏松的影响,大量的研究表明诱导或抑制经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中相关因子的表达或改变它们的活性功能,能够影响成骨细胞的发育、分化、骨基质的形成和矿化,从而促进或抑制骨形成,并且能够间接影响破骨细胞的发生和骨吸收,导致骨量的变化,从而产生对骨质疏松症的效应。

β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键调节分子,能与核内转录因子(TCF/LEF)DNA 结合改变 DNA 结构,启动下游 Runx2 及 Osx 等靶基因的转录,促进成骨细胞分化增值,有学者观察发现 β -catenin 基因缺失的成骨细胞形成的早期阶段没有形成骨形成标志物的骨钙蛋白,并且没有见成骨细胞转录因子 Osterix 的表达,可见 β -catenin 是成骨细胞分化与功能的经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中的重要调节因子。Runx2 是可通过对经典 Wnt/ β -catenin 信号通路上调前成骨细胞、软骨细胞中各种矿化相关蛋白基因的转录,使其向成骨细胞方向分化,促进骨形成,从而影响正常骨骼的发育。Osx(Osterix)是一种具有典型转录因子结构特征的多肽,并且只在发育的骨组织中特异性表达,能够调控成骨细胞多种功能蛋白及骨形成标志物的表达,促进骨矿化,实现骨形成,是成骨细胞分化和骨形成过程中所必需的转录因子,Runx2 是成骨细胞分化途中 Osx 的上游调控基因,Runx2 对于 Osx 的表达是必需的^[3]。

本实验采用 RT-PCR 对成骨细胞上经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键因子 β -catenin、Runx2、Osx 的 mRNA 表达量进行研究发现:补肾活血含药

血清培养的成骨细胞的 β -catenin、Runx2 及 Osx mRNA 表达与正常培养基组均有增加, 均比生理盐水培养基组有明显的提高, 表明补肾活血含药血清可能激活了经典 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促使成骨细胞的 β -catenin、Runx2 及 Osx 的 mRNA 表达增加。

总之, 本实验发现补肾活血含药血清能明显促进成骨细胞的分化增殖, 促进骨形成及骨矿化, 并且可增加 β -catenin、Runx2、Osx 的表达, 可以推测补肾活血含药血清通过激活经典 Wnt/ β -catenin 信号通路对成骨细胞产生促进作用, 这是可能作用机制之一, 但目前这只是从本实验中得到的推断结论, 对于补肾活血颗粒防治骨质疏松症的具体机制还有待于进一步的深入研究与总结。

参考文献

[1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南 (2011)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(1): 2-17.
The Chinese Medical Association of Osteoporosis and Bone Mineral Disease. Diagnosis and treatment of primary osteoporosis guidelines (2011)[J]. Zhonghua Gu Zhi Shu Song He Gu Kuang Yan Ji Bing Za Zhi, 2011, 4(1): 2-17. Chinese.

[2] 许兵, 金红婷, 刘慧, 等. 补肾活血颗粒对去势大鼠骨组织 Wnt β -catenin 通路的影响研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(11): 3400-3405.
Xu B, Jin HT, Liu H, et al. Research on the impact of *Bushen Huoxue* particles on the Wnt/ β -catenin signaling pathways in ovariectomized rats[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2013, 28(11): 3400-3405. Chinese.

[3] 程婉, 汤小康, 应航, 等. 牵张应力环境下六味地黄汤含药血清对成骨细胞增殖分化影响的实验研究[J]. 中国骨伤, 2013, 26(2): 142-146.
Cheng W, Tang XK, Ying H, et al. Influence of serum containing *Li-wei Dihuang* decoction on proliferation of osteoblasts under stretch-stress environment[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(2): 142-146. Chinese with abstract in English.

[4] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis[J]. Lancet, 2006, 17: 2010-2018.

[5] 许兵, 方剑利, 刘慧, 等. 补肾活血方对去势大鼠骨质疏松的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(3): 177-182.
Xu B, Fang JL, Liu H, et al. The experimental study of influence of bushenhuoxue in ovariectomized rats[J]. Zhonghua Gu Zhi Shu Song He Gu Kuang Yan Ji Bing Za Zhi, 2011, 4(3): 177-182. Chinese.

[6] 刘慧, 许兵, 方剑利, 等. 补肾活血颗粒对去势大鼠血生化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1435-1438.
Liu H, Xu B, Fang JL, et al. Research on the effect of *Bushenhuoxue* granules in ovariectomized rats of blood biochemical[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2012, 27(5): 1435-1438. Chinese.

[7] Xu B, Chen RP, Liu H, et al. Influence of invigorating kidney and promoting blood circulation Chinese medicine on the osteoblast[J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(14): 2180-2182.

[8] Nguyen H, Qian JJ, Bhamagar RS, et al. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by peptide coated matrix in hydrogels[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(1): 179-186.

[9] 李玲慧, 丁道芳, 杜国庆, 等. 蛇床子素对新生大鼠成骨细胞增殖的影响及相关机制研究[J]. 中国骨伤, 2013, 26(5): 419-422.
Li LH, Ding DF, Du GQ, et al. Effect of osthole on proliferation of neonatal rat osteoblast and the relative mechanism research[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(5): 419-422. Chinese with abstract in English.

(收稿日期: 2014-08-18 本文编辑: 王宏)

·读者·作者·编者·

在线浏览《中国骨伤》杂志全文的通知

《中国骨伤》杂志社自 2010 年正式启用稿件远程处理系统以来, 读者、作者和编者即可在线 <http://www.zggszz.com> 浏览《中国骨伤》杂志全文。

读者、作者和编者可通过 <http://www.zggszz.com> 注册的 E-mail 和密码登录, 在线浏览《中国骨伤》杂志全文。读者需在线充值方可浏览, 作者是指自 2011 年第 1 期刊登文章的所有第一作者和通讯作者可免费在线浏览, 编委和特约审稿人可免费在线浏览。

欢迎广大的读者、作者和编者在线浏览《中国骨伤》杂志全文。

《中国骨伤》杂志社