

复方贞术调脂胶囊调控 MEKK2-Wnt 偶联拮抗 β -catenin 泛素化改善大鼠糖皮质激素骨质疏松症

洪郭驹^{1,2,3}, 陈鹏^{1,2}, 韩晓蕊⁴, 何伟^{1,2}, 孙平^{5*}

(1. 广州中医药大学岭南医学中心国家重点学科中医骨伤科学实验室, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院关节骨科, 广州 510405; 3. 西澳大利亚大学生物医学科学院, 珀斯 6009; 4. 广州市第一人民医院放射科, 广州 510006; 5. 广东药科大学第一附属医院骨内科, 广州 510000)

【摘要】 目的 探究复方贞术调脂胶囊 (FTZ) 干预下调促分裂原活化蛋白激酶激酶 2 (mitogen-activated protein kinase kinase 2, MEKK2)-Wnt 偶联拮抗 β -catenin 泛素化, 及对骨量变化、细胞成骨能力的影响。**方法** SPF 级雄性大鼠随机均分为正常对照组、甲强龙组 (模型组)、甲强龙 + 生理盐水组 (空白对照组) 和甲强龙 + FTZ 组 (实验组)。分别对股骨近端松质骨进行 Micro-CT 检查、组织病理染色, 测定 Wnt3a、MEKK2、 β -catenin 蛋白表达; 提取模型 BMSCs, 经 FTZ 含药血清干预后, 进行碱性磷酸酶和茜素红染色; 测定成骨分化相关基因 ALP、Runx2、OCN 表达; 测定 MEKK2、 β -catenin 蛋白表达; 以及 β -catenin/TCF 转录水平。**结果** 1) 在 Micro-CT 中, 实验组与模型组相比, 前者 BV/TV、Tb. Th、Tb/N 等值降低, Tb/sp 升高 ($P < 0.05$)。ROI 三维重建可见实验组骨小梁骨质改善, 局部性修复; 2) 经苏木精-伊红染色中, 实验组可见骨小梁密度较模型组高、骨小梁形态较好; 3) 实验组骨组织中 Wnt3a、MEKK2、 β -catenin 表达较模型组增加 ($P < 0.05$); 4) GIOP 大鼠模型提取 BMSCs 并予 BMP2 诱导, 经 FTZ 含药血清 (实验组) 干预后, 碱性磷酸酶和茜素红染色结果提示实验组成骨反应增强 ($P < 0.05$); 5) BMSCs 经 FTZ 含药血清干预, 可提高 β -catenin/TCF 转录活性 ($P < 0.05$); 促进 β -catenin、MEKK2 蛋白表达 ($P < 0.05$)。**结论** FTZ 通过调控 MEKK2-Wnt 偶联拮抗 β -catenin 泛素化防治 GIOP, 从而改善微观骨性结构。

【关键词】 糖皮质激素性骨质疏松; 复方贞术调脂胶囊; Micro-CT; BMSCs; 成骨

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0036-09

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.006

Ameliorating effect of the Chinese traditional medicine Fufang Zhenzhu Tiaozhi Capsules on glucocorticoid-induced osteoporosis by antagonizing β -catenin ubiquitination and its mechanism of action

HONG Guojun^{1,2,3}, CHEN Peng^{1,2}, HAN Xiaorui⁴, HE Wei^{1,2}, SUN Ping^{5*}

(1. National Key Laboratory of Key Discipline and the Chinese Medicine Orthopedics, Medical Center of Southern China of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China. 2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405. 3. School of Biomedical Science, the University of Western Australia, Perth, 6009, Australia. 4. Radiographic Department of Radiology, Guangzhou First's Hospital, Guangzhou 510006. 5. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000)

Corresponding author: SUN ping. E-mail: sing_ping@163.com

【基金项目】 广州中医药大学 2017 年度“高水平大学建设”青年项目 (No. A1-AFD018171Z11076); 国家自然科学基金项目 (青年科学基金) (No. 81603641, No. 81704098)。

Funded by 2017 High Level of University Construction of Guangzhou University of Chinese Medicine (No. A1-AFD018171Z11076); National Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81603641, No. 81704098)

【作者简介】 洪郭驹 (1990 -), 男, 临床医学硕士, 医师, 研究方向: 骨质疏松基础与临床研究。Email: gdsthgj@foxmail.com;

陈鹏 (1984 -), 男, 临床医学博士, 主治医师, 研究方向: 骨质疏松基础与临床研究。Email: docchen008@163.com

【通信作者】 孙平 (1980 -), 女, 临床医学博士, 主治医师, 研究方向: 骨质疏松基础与临床研究。Email: sing_ping@163.com

[Abstract] Objective To establish a rat model of glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) and to explore the interventional effect of the Chinese medicine Fufang Zhenzhu Tiaozhi (FTZ) capsules on regulation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 (MEKK2)-Wnt coupling and inhibiting β -catenin ubiquitination, and to investigate the effect of FTZ on the bone mineral density and cell osteogenic ability. **Methods** SPF male rats were randomly divided into normal control group, methylprednisolone group (model group), methylprednisolone + saline group (blank control group) and methylprednisolone + FTZ group (experimental group). The proximal femoral cancellous bone was examined by micro-CT and histopathology, and assessment of expressions of Wnt3a, MEKK2, and β -catenin proteins. Bone mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated and treated with serum containing FTZ, stained by alkaline phosphatase and alizarin red. The expressions of osteogenic differentiation-related genes ALP, Runx2 and OCN, the expressions of MEKK2 and β -catenin proteins, and the transcription level of β -catenin/TCF were determined. **Results** 1) The micro-CT imaging showed that compared with the control group, the BV/TV, Tb. Th and Tb/N expressions were significantly decreased, and Tb/sp increased in the experimental group ($P < 0.05$). Region of interest (ROI) three-dimensional reconstruction of trabecular bone in the experimental group showed improvement of bone trabeculae and local bone repair. 2) The pathology using hematoxylin and eosin staining showed that in the experimental group, the bone trabecular density was higher than that of the model group, and observed a better trabecula morphology. 3) The Wnt3a, MEKK2 and β -catenin expressions in the experimental group were significantly increased compared with the model model ($P < 0.05$). 4) After treated with FTZ and BMP2, the result of alkaline phosphatase and alizarin red staining indicated an enhanced osteogenic response ($P < 0.05$) in the GIOP rat models. 5) After treatment with serum containing FTZ, The BMSCs isolated from the GIOP rats enhanced the transcriptional activity of β -catenin/TCF/LEF ($P < 0.05$) and promoted the expression of β -catenin and MEKK2 proteins ($P < 0.05$). **Conclusions** FTZ can ameliorate GIOP by regulating the MEKK2-Wnt coupling and inhibiting the β -catenin ubiquitination, and improve the bone microstructure.

[Key words] glucocorticoid-induced osteoporosis; Fufang Zhenzhu Capsule (a Chinese medicine); micro-CT; bone mesenchymal stem cells; BMSCs; osteogenesis; rat

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

糖皮质激素性骨质疏松症 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是由于长期使用糖皮质激素 (GC) 所导致的骨代谢紊乱, 主要表现为血清游离脂肪酸含量增高、骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加和易于骨折^[1-2]。而 GC 作为最具有治疗效力的抗炎和免疫抑制药物广泛应用于炎症性和自身免疫性疾病等多种疾患的治疗中, 临床应用的人群规模也在逐渐扩大^[3-4]。长期接受 GC (>6 个月) 治疗的慢性疾病人群, 最终有 30%~50% 发展为骨质疏松症^[5-6]。GC 介导 β -catenin 泛素化经证实与促分裂原活化蛋白激酶激酶 2 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2, MEKK2) 和 Wnt 信号传递与偶联密切相关, 而有效药物对偶联的促成骨分化作用, 将有助于在防治 GIOP 治疗思路中寻求新突破。

以“补肾祛湿”法为代表的中医方剂对防治 GIOP 有着良好的应用前景, 并在中国积极而广泛的运用于临床, 可针对性地解决 GIOP 中由于长期大量的 GC 导致的“肾虚脾虚”体内环境, 增强人体机能, 进而降低血脂含量, 提高和补充骨质。“补肾祛湿法”经验方复方贞术调脂胶囊 (FTZ) 在对抗骨丢

失方面有较强的潜力和效力^[7-9]。鉴于此, 本文建立 GIOP 大鼠模型, 采用 micro-CT、qRT-PCR 和 Western blot 等检验等方法, 观察 FTZ 对 GIOP 骨微结构影响以及调控 MEKK2-Wnt 偶联拮抗 β -catenin 泛素化防治 GIOP 作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Wistar 大鼠 48 只, SPF 级, 雄性, 体重 230~250 g, 由广东省医学实验动物中心提供【SCXK (粤) 2014-0035】。广州中医药大学动物实验中心【SYXK (粤) 2013-0001】标准饲养, 标准鼠粮适应性饲养 (含钙 1.19%、磷 0.85%、1045IU 维生素 D), 室温 (23±2)℃, 自由饮水, 光照和黑夜时间间隔 12 h, 定期消毒及通风, 各组大鼠均单笼培养。实验在广州中医药大学动物实验中心及广州中医药大学岭南医学中心国家重点学科中医骨伤科学实验室完成。

1.1.2 试剂与仪器

注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 (辉瑞公司, 美国); Lipopolysaccharide (Sigma 公司, 美国); Protease In-

hibitor Cocktail Set III (Calbiochem 公司, 美国); 一抗 Wnt3a 鼠抗、 β -catenin 兔抗 (Sigma 公司, 美国); MEKK2 兔抗 (Abcam 公司, 美国); GAPDH (CST 公司, 美国); HRP 山羊抗小鼠 IgG 二抗、HRP 山羊抗兔 IgG 二抗、碱性磷酸酶检测试剂盒、DEPC 处理水 (上海碧云天生物技术有限公司, 中国); 茜素红染色检测试剂盒 (广州赛业生物科技有限公司, 中国); PCR 试剂盒 (Roche 公司, 美国); PCR 引物 (生工生物工程 (上海) 有限公司, 中国); TP1020 自动脱水机 (Leica Biosystems 公司, 美国)、Autos 全自动染色机 (Leica 公司, 德国); BX53 显微镜 (Olympus 公司, 日本); micro-CT100 柜式锥形束微型 CT (Scanco 公司, 瑞士); Image-pro plus 软件 (Media Cybernetics 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

Wistar 大鼠 48 只, 随机分为 4 组: 正常对照组、甲强龙组 (MPS, 模型组): 参照 Hulley 的方法, 皮下注射甲强龙 (methylprednisolone, MPS) 5 mg/(kg·d), 每周 5 次、甲强龙组 (Met) + 皮下注射生理盐水 (空白对照组)、甲强龙组 (MPS) + FTZ 灌胃 (实验组)。各组适应性喂养 7 d 后进入实验期 12 周。

1.2.2 GIOP 造模与干预方法

GIOP 造模方法如下, 腹部肌肉注射 MPS 5 mg/(kg·d), 隔间 24 h 连续注射 6 次。注射 MPS 期间, 每天每只大鼠相应腹部处注射青霉素 10 万单位, 连续 6 次, 预防感染。腹部注射 FTZ 按照人的临床等量剂量换算。正常组注射与 FTZ 等体积生理盐水。

1.2.3 Micro-CT 检测

(1) 扫描参数: 由 Scanco 公司提供 μ CT100 柜式锥形束微型 CT。X 线 5 μ m 焦点直径, 30–90 kVp/20–50 keV (160 μ A); 探测器为 3072 $\times$ 400; 分辨率: 1.25 μ m, 4 μ m; 图像矩阵: 512 $\times$ 512 至 8192 $\times$ 8192。扫描尺寸为 100 mm $\times$ 140 mm (ϕ X1)。

(2) 扫描方法: 将纳入研究的 GIOP 大鼠及对照组通过尾静脉空气注射处死, 延双侧臀肌外侧切开, 暴露双侧股骨头, 用咬骨钳取下左侧股骨头及转子部 (不破坏及挤压股骨头部骨小梁)。给予 4% 多聚甲醛固定 2 周。将股骨纵轴与显微 CT 检查床滑轨的移动轴平行近端进行 micro-CT 扫描。对 micro-CT 扫描图像经校准后手动选取股骨头区域建立三维兴趣区 (region of interest, ROI), 兴趣区为完整股骨头区域。

(3) 检测指标: 组织体积 (TV, tissue volume)、骨体积 (BV, bone volume); 在直接测量和三角测量法 (triangulation, TRI) 模式下, 对骨小梁数量 (trabecular number, Tb. N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁分离度 (trabecular separation/spacing, Tb. Sp); 并进行三维重建。

1.2.4 苏木精-伊红 (HE) 染色

截取股骨全长并剔除周围肌肉, 沿正中冠状面剖开, 用 4% 甲醛溶液 (pH 7.4) 固定 48 h, 再置于 10% EDTA-Tris 缓冲液中脱钙, 隔天更换脱钙液, 直至完全脱钙以后, 流水冲洗, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明处理 2 h, 石蜡包埋、切片, 切片厚度为 4 μ m, 常规 HE 染色。光镜下观察骨髓腔内骨髓细胞、骨小梁及骨细胞形态等。

1.2.5 GIOP 大鼠来源 BMSCs 与 FTZ 干预

(1) 细胞培养: DMEM 培养基内含 100 IU 青霉素、100 μ g/mL 链霉素, 三维支架经 PBS 缓冲液冲洗后置于 DMEM 培养基中。选取 3.5 月龄 SPF 级雄性大鼠 20 只建立 GIOP 模型后 (方法同上述动物实验), 分离模型大鼠骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 细胞, 先在 DMEM 培养基中培养至细胞密度 2×10^6 个/40 μ L, 分别行成骨诱导分化。

(2) FTZ 含药血清制备: SPF 级雄性大鼠 10 只, 参照《药理实验方法学》中大鼠用量及体表面积计算得出 Wistar 大鼠的等效剂量, 以 5 倍等效剂量对 FTZ 含药血清组大鼠进行灌胃, 2 次/日, 连续给药 7 d, 第 8 天清晨一次灌服全天剂量, 1 h 后用体积分数 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉采集血液后在 3000 r/min 离心 15 min 后分别获得 FTZ 含药血清及正常大鼠血清, 相同组别大鼠血清合并, 经 56 $^{\circ}$ C 恒温水浴灭活 30 min, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.6 染色法检测成骨分化能力

将模型组大鼠腹部解剖, 收集腹主动脉血液, 并进行分离提取 BMSCs。将 BMSCs 分为四组, 包括空白对照组、50 ng/mL BMP2 (对照组)、20 ng/mL FTZ (实验组)。50 ng/mL BMP2 和 20 ng/mL FTZ 进行成骨诱导液诱导 BMSCs。

(1) 碱性磷酸酶 (ALP) 法检测细胞分化: BMSCs 使用胰酶进行消化, 以 1×10^4 mL $^{-1}$ 孔密度接种于 96 孔板 (设 6 个复孔), 培养 24 h, 吸去培养基, 加入相应的处理培养基, 培养 48 h 后, 根据 ALP 试剂盒说明书进行检测。

(2) 钙化结节染色: 将 BMSCs 以 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 孔密度接种于 6 孔培养板上, 培养 24 h, 根据分组加入相应的含药培养基 (每孔 2 mL), 每种浓度设 2 个复孔, 每 72 h 液一次, 连续培养 21 d, 经茜素红染色后, 显微镜观察钙化结节形成过程。

1.2.7 qRT-PCR

(1) cDNA 的合成: 按下列组份配置 RT 反应液 (在冰上进行): 反应液轻柔混合后进行反转录反应, 条件如下: 37°C 15 min、 85°C 5 sec、 4°C 。合成试剂: $1 \times \text{PrimeScript RT Master Mix}$ (Perfect Real Time), 2 μL ; RNase Free dH_2O , 10 μL 。

(2) 荧光定 PCR 分析: PCR 验证成骨细胞标志物 ALP、Runx2、OCN 表达; 通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进入 Genbank 数据库, 查找相应的基因序列, 根据基因 mRNA 的序列, 利用 Primer3Plus 软件进行引物设计, 利用 Oligo7 软件对引物结构进行分析, 利用网站进行引物的特异性分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)。设置 NTC 对照以验证实验材料有无污染、NRT 对照以明确有无基因组污染。以 β 照以明确有无为内参, 每个样品 3 复孔, 按下列组份配置 PCR 反应液 (在冰上进行): $1 \times \text{SYBR Premix Ex Taq II}$ (Tli RnaseH Plus) (2 $\times$), 12.5 μL ; 0.4 mmol/L $\times$ PCR Forward Primer (10 μL), 1 μL ; 0.4 mmol/L $\times$ PCR Reverse Primer (10 μL), 1 μL ; DNA 模版 ($< 100 \text{ ng}$), 2 μL ; dH_2O (灭菌蒸馏水) (8.5 μL)。

(3) 采用两步法 PCR 扩增标准程序: Step1: 95°C 30 s; Step2: PCR 反应; GOTO: 39 (40 Cycles); 95°C 5 s; 60°C 30 s; Step3: Melt Curve。根据扩增效率选择 $\Delta\Delta$ 据扩法或 Pfaffl 法统计各组各感兴趣基因相对表达量的差异, 并将 RT-qPCR 的结果与 RNA-seq 定量分析的结果进行 Pearson 相关分析。

1.2.8 Western blot 检测

样品制备: 对于骨组织, 用液氮预冷, 从液氮中取出德股骨头称重后放入研磨钵中, 研磨至粉末状, 按 50 mg 骨组织/200 μL RIPA 裂解液制备样品。BMSCs 用裂解液裂解细胞, 刮净培养板, SDS-PAGE: 分别制备 10% 分离胶、5% 浓缩胶, 待凝胶聚合后, 注入电泳缓冲液。样品裂解液与上样缓冲液按 5:1 充分混匀, 置沸水浴中加热 5 min, 冷却后用微量移液器吸取样品与预染蛋白 marker 点样并电泳。转膜缓冲液中制作滤纸、凝胶、PVDF 膜 “三明治”, 350 mA 转膜 3 h。取出 PVDF 膜置于盛有 5%

脱脂奶粉的封闭液的平皿中, 置于摇床上室温封闭 1 h。倾倒封闭液, 加入一抗 (Wnt3a、MEKK2、p-MEKK2/3、 β -catenin 按 1:1000 稀释, GAPDH 按 1:2000 稀释), 摇床上室温振荡孵育 2~4 h, 孵育过夜。回收一抗, 用 TBST 洗涤 3~5 次, 每次 10 min。加入相应二抗 (1:1000)。TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, TBS 洗涤 1 次, 1 min。将发光显色试剂盒中的显色剂 A 和 B 等体积混合后, 加在 PVDF 膜上充分接触反应 2 min 后, 将 PVDF 膜移至另一保鲜袋中, 放入凝胶成像系统中进行成像分析。先曝光约 3~5 min, 根据信号的强弱适当调整曝光时间, 分析结果, 使用 image-pro plus 软件进行半定量分析。

1.2.9 Luciferase 报告实验

以 TOPFlash 为报告质粒, FOPFlash 为阴性对照。用 lipofectamine 3000 转染。转染质粒前 24 h 将 BMSCs 以 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 孔密度接种至 96 孔板中, 根据操作说明书向每孔中转染 TOP-Flash 或 FOP-Flash 和 pRL-TK 质粒共转染 BMSCs。转染 24 h 后按空白对照组、BMP2、FTZ 更换诱导液, 继续培养 48 h, 随后裂解细胞。采用双荧光素酶报告系统在多功能微孔板分析仪上测定光值, 读取荧光值和吸光值, 二者的比值即为该质粒转染细胞所得的荧光素酶的相对活性。以对照组均值为 100% 计, 其他处理组与对照组的比值为相对 β -catenin/TCF/LEF 转录活性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用组间两独立样本 t 检验及方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 GIOP 造模过程事件分析

Wistar 大鼠 48 只。36 只用于建立 GIOP 模型, 其有 2 只在注射 MPS 后 24 h 死亡, 34 只存活, 存活率为 95%, 补足后。甲强龙组 (模型组)、甲强龙 + 生理盐水灌胃组 (阴性对照组)、甲强龙 + FTZ 灌胃 (实验组) 在除甲强龙干预前共有 36 只出现骨质疏松征象, 骨质疏松发生率为 90% (9/10)。

2.2 GIOP 模型造模与干预评价

Wistar 大鼠用于建立 GIOP 模型: 模型组: 骨小梁稀疏变细, 出现骨髓细胞碎片, 细胞数目及网状结构较正常稀疏。正常组: 骨小梁完整, 骨小梁中的骨细

胞清晰可见。可见成骨活动较为活跃,骨小梁形态较好;D 为阳性对照组。各组骨小梁与组织体积比比较,实验组与模型组之间差异有显著性($P < 0.05$)。(见图 1)

2.3 Micro-CT 检测 GIOP 模型骨微结构

Micro-CT 检测发现,模型组与正常对照组相比,前者 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 值降低,Tb. Sp 值升高($P < 0.05$)。实验组与模型组相比,前者 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 值升高,Tb. Sp 值降低($P < 0.05$),差异有显著性($P < 0.05$),空白对照组相应指标与模型组差异有显著性($P < 0.05$)(图 2B)。ROI 三维重建可见模型组骨小梁紊乱,可见普遍断裂,骨质较少;实验组相对而言骨质改善,骨小梁有局部性修复,说明 FTZ 增加 GIOP 大鼠模型的骨小梁修复和促进微观骨性结构改善(图 2A)。

2.4 FTZ 调控骨组织内 Wnt3a、MEKK2、β-catenin 蛋白表达

运用 Western Blot 进行检测 MEKK2-Wnt 偶联的关键蛋白 Wnt3a、MEKK2、β-catenin 蛋白表达水平。结果如图 3 显示,在实验组内,Wnt3a 蛋白表达水平较模型组高,MEKK2 蛋白表达水平较模型组升高,β-catenin 蛋白表达水平较模型组增高,模型组与空白对照组差异无显著性($P > 0.05$),提示 FTZ 调控骨组织内 Wnt3a、MEKK2、β-catenin 蛋白表达,通过 MEKK2-Wnt 偶联信号通路从而促进 GIOP 成骨功能。

2.5 FTZ 促进碱性磷酸酶染色和茜素红染色

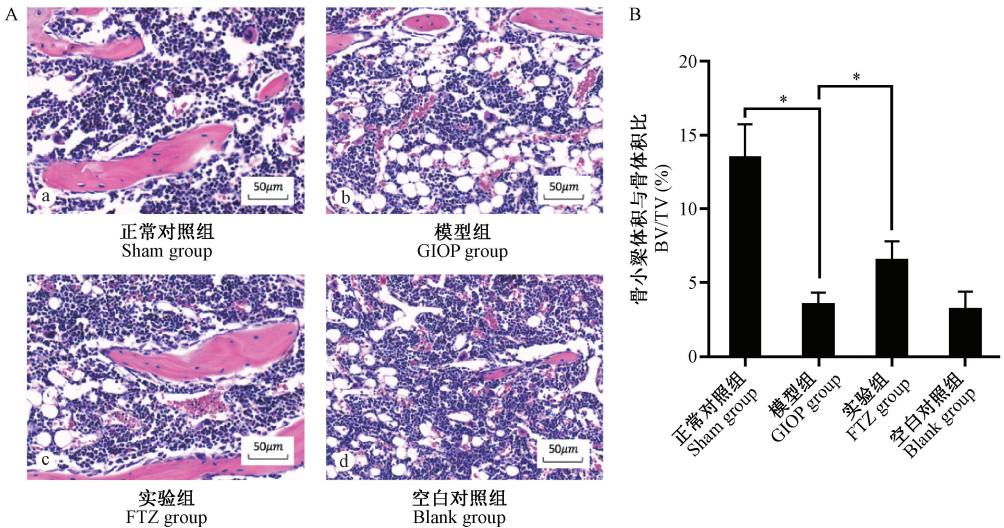
同等干预条件下,各组 BMSCs 接受经茜素红染色检测矿化结节,如图 4 A、B 所示。BMP2 和 FTZ 干预后形成的矿化密度均显著高于对照组,差异有显著性($P < 0.05$),FTZ 处理组矿化密度较 BMP2 处理组少,结果提示 FTZ 能显著增强 BMP2 的矿化能力。如图 4C、D,与对照组相比,FTZ 对正常大鼠 BMSCs 具有成骨诱导作用,可显著提高细胞 ALP 活性,差异有显著性($P < 0.05$),但较 BMP2 诱导效能较弱,差异无显著性($P > 0.05$)。

2.6 FTZ 对成骨相关基因的表达作用影响

分组同前,在干预和诱导 BMP2 和 FTZ 后,提取细胞总 RNA, qRT-PCR 检测成骨相关基因 ALP、Runx2、OCN 的 mRNA 表达水平,结果如图 5 A 显示,BMP2 与 FTZ 诱导组的 ALP、Runx2、OCN 基因表达均比对照组高,差异有显著性($P < 0.05$)。与 ALP 活性检测和茜素红染色实验结果相一致。结果表明 FTZ 对体外诱导 BMSCs 向成骨细胞分化的相关基因有促进作用。

2.7 FTZ 调控 MEKK2、β-catenin 蛋白表达

分组同前,对 BMSCs 进行 BMP2 和 FTZ 干预诱导、诱导后行 Western Blot 检测 MEKK2 和 β-catenin 蛋白表达水平,结果如图 5B-C 显示,BMP2 和 FTZ 干预 BMSCs 均能明显提高 β-catenin 的蛋白水平,差异有显著性($P < 0.05$)。MEKK2 与 β-catenin

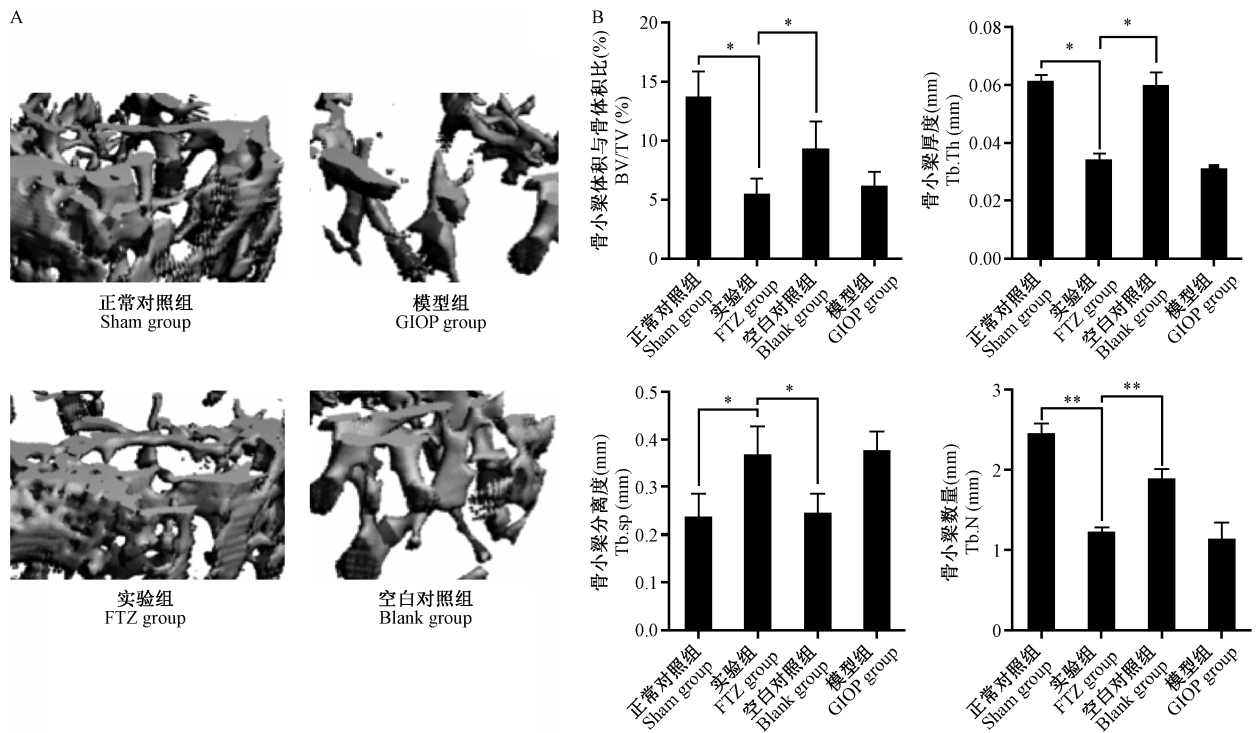


注:A. 正常对照组(a)、模型组(b)、实验组(c)、空白对照组(d);B. 各组 BT/TV 比值。($\bar{x} \pm s, g$), * $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠镜下组织病理切片($\times 100$)

Note. Fig. 1 A: sham group (a), GIOP group (b), FTZ group (c), blank Group (d). Fig. 1B: Ratio of BT/TV for each group ($\bar{x} \pm s, g$), * $P < 0.05$.

Fig. 1 Histological changes in bone tissues of the rats

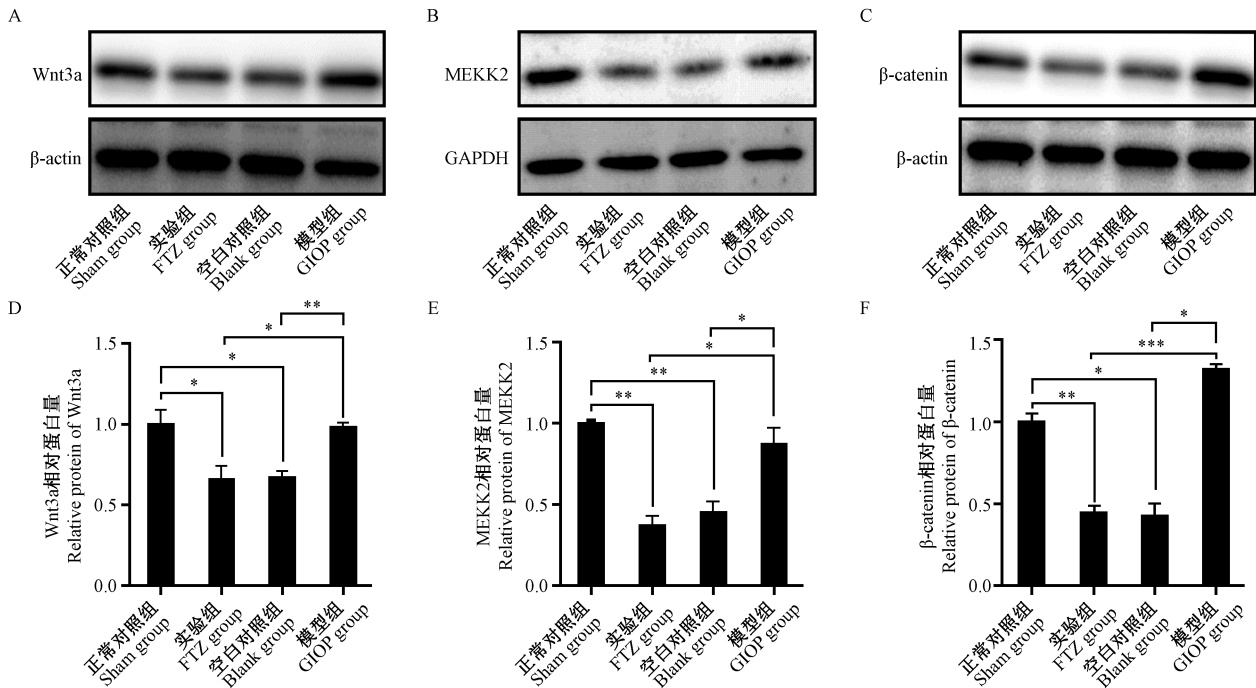


注: A. 各组 Micro-CT 三维重建影像($\bar{x} \pm s, g$); B. 各组 BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp 等参数比较。正常对照组、模型组、实验组、空白对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 Micro-CT 和三维重建

Note. A. Three-dimensional micro-CT images of each group ($\bar{x} \pm s, g$). B. BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Tb. Sp of the sham group, GIOP group, FTZ group, and blank Group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Micro-CT and three-dimensional reconstruction of bones

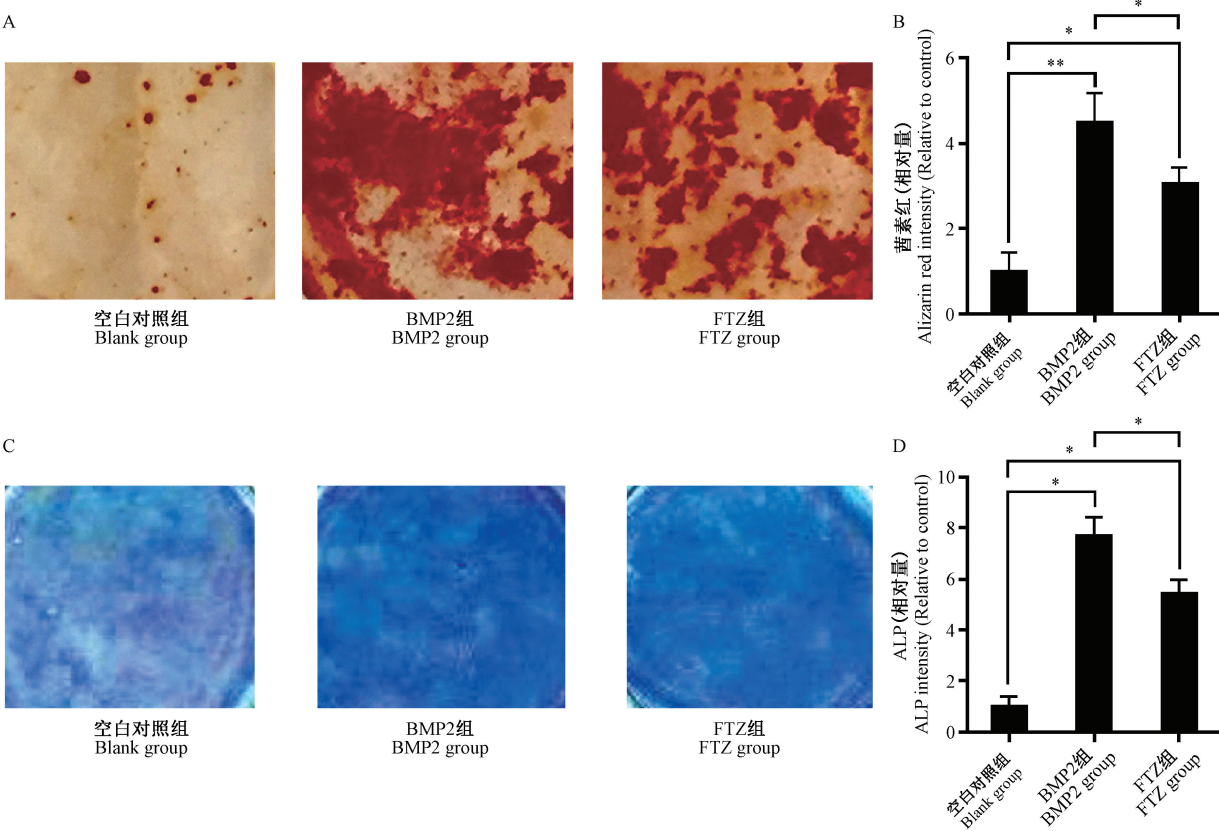


注: 骨组织内 Wnt3a(A、D)、MEKK2(B、E)、β-catenin(C、F) 蛋白表达($\bar{x} \pm s, g$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 FTZ 对骨组织内蛋白表达的作用

Note. Protein expression of Wnt3a (A, D), MEKK2 (B, E), β-catenin (C, F) in bone tissue ($\bar{x} \pm s, g$). Sham group, GIOP group, FTZ group, and blank control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 3 Effect of FTZ on proteins in the bone tissues



注:A~B. 空白对照组、BMP2 组、FTZ 组的茜素红染色检测及矿化密度比较;C~D. 各组 ALP 染色检测及 ALP 密度比较。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 大鼠骨组织中矿化密度的变化(茜素苏红染色和 ALP 染色, $\times 200$)

Note. A-B: blank group, BMP2 group, FTZ group ($\bar{x} \pm s, g$), alizarin red staining. C-D: ALP staining and ALP density ($\bar{x} \pm s, g$).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 4 Changes of mineralization density of the rat bone tissues(Alizarin red staining and ALP staning)

变化规律保持基本一致,经 FTZ 干预后,BMP2 和 FTZ 组蛋白水平较前逐步上升,差异有显著性($P < 0.05$)。

2.8 FTZ 促进 β -catenin/TCF/LEF 转录活性

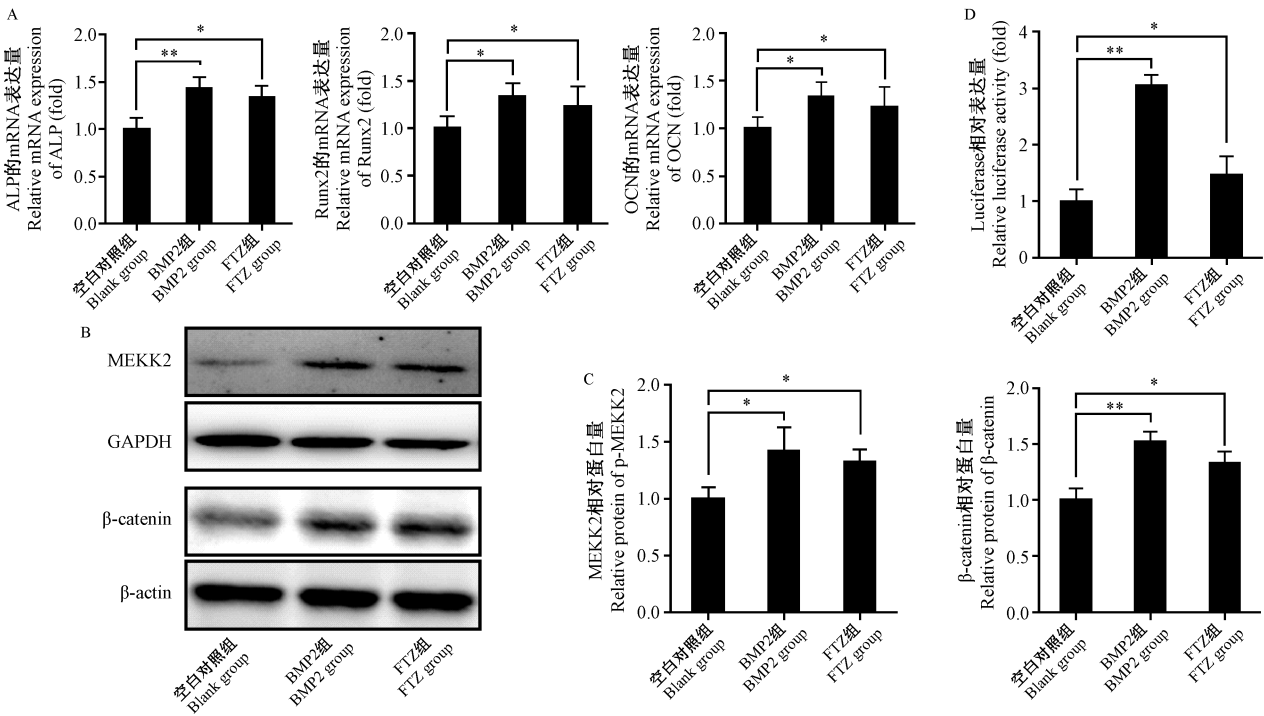
本实验通过检测 β -catenin/TCF/LEF 转录活性,证实 FTZ 对 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶基因的激活作用,向 BMSCs 共转染 TOP-Flash 质粒和海肾荧光素酶载体 pRL-TK 进行荧光素酶检测。结果如图所示,与对照组相比,FTZ 处理组 TOP-Flash 报告基因的荧光素酶活性显著增强,FOP-Flash 报告基因没有明显变化,在阴性对照组中结果相反。结果说明 FTZ 可增强 β -catenin/TCF/LEF 转录活性,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶基因的表达,差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

GIOP 是由于长期使用糖皮质激素 (glucocorti-

coid, GC) 所导致的骨代谢紊乱所致,主要表现为血清游离脂肪酸含量增高,骨髓间充质干细胞 (BM-SCs) 成骨分化降低,骨量减少^[1, 2, 10]。作为继发性的骨质疏松症,GIOP 是中青年人群发生骨质疏松症和医源性骨质疏松症的重要诱因^[10-11]。如何拮抗 GC 副作用以有效防治 GIOP 中骨代谢紊乱具有关键性意义。(1) 目前认为 GC 通过经典 Wnt/ β -catenin 通路扰乱骨细胞分化^[12]。而另有研究认为,MEKK2 经非经典 β -catenin 通路调控,是抑制脂肪堆积,稳定成骨细胞活性的另一关键环节,与 Wnt 通路通过偶联机制共同对 β -catenin 泛素化进行调控^[13]。

GC 抑制 Wnt/ β -catenin 经典通路,加速 β -catenin 磷酸化降解,从而激活泛素系统是造成 GIOP 的重要环节和基础分子机制。MEKK2 可有效的维持 β -catenin 的稳定。研究表明,过表达的 MEKK2 会导致 β -catenin 表达呈剂量依赖性的增加,而正是这



注:A. FTZ对空白对照组、BMP2组、FTZ组成骨相关基因 ALP、Runx2、OCN的干预表达作用(从左至右, $\bar{x} \pm s, g$);B-C. FTZ对BMSCs干预后 p-MEKK2/3和 β -catenin蛋白表达变化($\bar{x} \pm s, g$);D. FTZ对 β -catenin/TCF/LEF转录活性作用影响, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 FTZ对BMSCs的蛋白、基因表达干预

Note. A. Effect of FTZ on osteoblast related genes ALP, Runx2, OCN for blank group, BMP2 group and FTZ group (from left to right, $\bar{x} \pm s, g$). B-C. p-MEKK2/3 and β -catenin proteins in BMSCs in the presence of FTZ ($\bar{x} \pm s, g$). D. Effect of FTZ on the transcriptional activity of β -catenin/TCF/LEF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 5 Interventional effect of FTZ on the expression of proteins and genes in the BMSCs

一种正向调控作用对维持成骨细胞内 β -catenin 的稳定性至关重要。MEKK2 属于 MAPK 家族中 MEKK/SET11 亚家族成员。最初 MEKK2 作为 JNK 信号途径强有力的激活剂,主要的认识在于激活 ERK1/2、ERK5 和 P38 等其他 MAPK 信号转导途径,进而影响成骨细胞的增殖、分化、凋亡等生理过程^[14]。但随后这一价值被进一步研究,而 MEKK2 作为骨形成调控的重要性也逐步凸现。研究者在敲除了 *Mekk2*^{-/-} 狗的颅盖骨培养的成骨细胞中,发现成骨指标 COL- I、骨涎蛋白(Bsp)、骨钙素(OC)表达显著降低,细胞矿化能力减弱和骨形成率降低。在 *Mekk2*^{-/-} 和 *Fgf2*^{-/-} 小鼠的表型中观察到,动物模型骨量的减少和骨量降低一致,表明 FGF2/MEKK2 作为一个调控共同体有助于维持成人骨量^[15]。

MEKK2 通过非经典通路来抑制 β -catenin 泛素化,控制 β -catenin 的稳定性以维持骨细胞活性。该途径在生物化学和功能上均独立于经典的 Wnt 介导的 β -catenin^[13, 16]。具体的信号路径如下: FGF2

激活 MEKK2, 并且在 S675 活化 MEKK2, 导致 USP15 的募集, USP15 进一步从 β -catenin 中去除泛素,防止其组成蛋白酶产生依赖性周转。区别于经典 Wnt 刺激通过阻止 β -catenin 泛素化起作用,但 MEKK2 途径促进 β -catenin 去泛素化^[17]。虽然 MEKK2 和 Wnt 途径似乎是不同的,但是这两个途径均通过逆转或阻止 β -catenin 的基础泛素化和降解以发挥其促进细胞成骨分化和活性增强作用。MEKK2-Wnt 这一分子偶联模型的构建业已被论证和详细阐述,并对骨代谢起着重要作用。

基于上述的分子偶联模型,本研究尝试运用中药复方进行偶联的节点介导,解析“补肾祛湿法”精细化调控 MEKK2-Wnt 偶联以拮抗 GC 作用靶点和效用性,并逐步推广于临床实践指导。因此,本实验采用“补肾祛湿法”的经验方 FTZ 作为干预的中药复方。该中成药主要用于调脂、抑斑块、保护内皮等一系列心血管作用。超剂量 GC 作用下能够诱导 BMSCs 向脂肪细胞分化,增加了脂肪细胞沉积,病理性失调导致机体骨代谢紊乱,进而引发出出现成骨

细胞凋亡。从中医药的角度,该病机属于“肾虚兼湿邪内阻”,因此采用“补肾祛湿法”是针对 GC 导致骨代谢紊乱副作用的治法。利用 FTZ 的效用性在 GIOP 中精细化 MEKK2-Wnt 偶联,从而拮抗 GC 副作用,改善骨微环境的骨脂代谢功能,促进成骨分化和抑制骨丢失,是本项目组根据传统中医药对于 FTZ 补肾化湿的药效定义,及大量中医药临床实践所提出来的科学假设。

综上所述,本研究从动物实验和细胞培养两个层面观察 FTZ 对 GIOP 大鼠的防治作用,同时运用分子生物学技术,明确了 FTZ 对 Wnt/ β -catenin 信号通路中关键因子 MEKK2、Wnt3a、 β -catenin 等的表达变化,测定成骨分化相关基因 ALP、Runx2、OCN 表达,并对成骨功能进行初步验证,为临床防治 GIOP 的合理用药提供实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Overman RA, Yeh JY, Deal CL, et al. Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2013, 65 (2): 294 – 298.
- [2] Rizzoli R. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2012, 91 (4): 225 – 243.
- [3] Díez-Pérez A, Hooven FH, Adachi JD, et al. Regional differences in treatment for osteoporosis. The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW) [J]. *Bone*, 2011, 49 (3): 493 – 498.
- [4] Silverman S, Curtis J, Saag K et al. International management of bone health in glucocorticoid-exposed individuals in the observational GLOW study [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26 (1): 419 – 420.
- [5] Tian L, Yu X. Lipid metabolism disorders and bone dysfunction – interrelated and mutually regulated (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (1): 783 – 794.
- [6] Hernández JL, Olmos JM, Romaña G et al. Bone mineral density in statin users: a population-based analysis from a Spanish cohort [J]. *J Bone Miner Metab*, 2014, 32 (2): 184 – 191.
- [7] 孙平, 蔡妹群, 董群伟, 等. 复方贞术调脂胶囊对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠骨量和骨转换指标的研究 [J]. *海南医学*, 2016, 27 (01): 3 – 6.
- [8] Sun P, Cai MQ, Dong QW, et al. Effects of Fufang Zhenzhu Tiaozi on bone mass and bone turnover markers in rat models with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Hainan Med*, 2016, 27 (01): 3 – 6.
- [9] 孙平, 胡伶平, 董群伟, 等. 复方贞术调脂胶囊对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠股骨和腰椎骨密度及生物力学特性的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22 (02): 135 – 138.
- [10] Sun P, Hu LP, Dong QW, et al. Effect of FTZ on BMD and biomechanics in the femur and lumbar vertebrae in glucocorticoid-treated rats [J]. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22 (02): 135 – 138.
- [11] 孙平, 虎松艳, 巫培康, 等. 复方贞术调脂胶囊对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠血脂和骨转换指标的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22 (10): 1308 – 1310.
- [12] Sun P, Hu XY, Wu KP, et al. Effects of FTZ on blood lipids and bone turnover markers in glucocorticoid-treated rats [J]. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22 (10): 1308 – 1310.
- [13] Kok C, Sambrook PN. Secondary osteoporosis in patients with an osteoporotic fracture [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2009, 23 (6): 769 – 779.
- [14] Komori T. Glucocorticoid signaling and bone biology [J]. *Horm Metab Res*, 2016, 48 (11): 755 – 763.
- [15] Gueñabens N, Gifre L, Peris P, et al. The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2014, 12 (1): 90 – 97.
- [16] Greenblatt MB, Shin DY, Oh H, et al. MEKK2 mediates an alternative β -catenin pathway that promotes bone formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 133 (9): 1226 – 1235.
- [17] Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 136 (2): 216 – 226.
- [18] Montero A, Okada Y, Tomita M et al. Disruption of the fibroblast growth factor – 2 gene results in decreased bone mass and bone formation [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105 (8): 1085 – 1093.
- [19] X Tu, J Delgadocalle, KW Condon et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ β -catenin signaling in bone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (5): E478-E486.
- [20] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149 (6): 1192 – 1205.

[收稿日期] 2017 – 08 – 07