

异补骨脂素介导 BMP2/Runx2/Osx 信号通路促进成骨细胞增殖和分化的研究*

张有为¹, 黄晨², 黄廷锐², 唐德志^{2**}

(1. 陕西省宝鸡市中心医院 宝鸡 721008; 2. 上海中医药大学附属龙华医院 上海 200032)

摘要:目的 本实验旨在探讨异补骨脂素对成骨细胞增殖和分化的影响及其可能的作用机制。方法 常规复苏培养前成骨细胞株 OCT1 细胞, 分别给予异补骨脂素低剂量($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中剂量($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高剂量($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行干预 48 h, 同步采用骨形态发生蛋白 2 (Bone morphogenetic protein 2, BMP2) 纯化蛋白 ($50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为阳性对照。MTT 法观察细胞增殖情况; 实时荧光定量 RT-PCR 反应检测 BMP2、Runx2 相关转录因子 2 (Runx-related transcription factor 2, Runx2) 和成骨细胞特异性转录因子 (Osterix, Osx) mRNA 的表达; Western blot 检测 Runx2 和 Osx 蛋白的表达; 从 BMP2^{loxP/loxP} 小鼠中分离培养原代颅盖骨成骨细胞, 利用体外条件性基因敲除技术敲除 BMP2 基因后, 给予最佳浓度的异补骨脂素干预 48 h 后, 采用实时荧光定量 RT-PCR 反应检测 Runx2 和 Osx 基因表达的情况, 并利用碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 染色观察成骨细胞中 ALP 活性变化的情况。结果 MTT 法检测结果显示, 异补骨脂素能促进成骨细胞的增殖, 但以低剂量 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组最明显 ($P < 0.05$); 实时荧光定量 RT-PCR 反应结果表明, 异补骨脂素低剂量 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和中剂量 ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 能促进成骨细胞 BMP2 mRNA 的表达, 以前者作用最佳 ($P < 0.05$)。异补骨脂素低剂量 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可明显促进成骨细胞 Runx2 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。异补骨脂素低剂量 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和中剂量 ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 能促进成骨细胞 Osx mRNA 的表达。Western blot 检测结果显示, 异补骨脂素低剂量 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和中剂量 ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 能促进成骨细胞中 Runx2 蛋白的表达。此外, 异补骨脂素低剂量 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中剂量 ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和高剂量 ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 均可提高 Osx 蛋白的表达量。体外条件性基因敲除实验结果显示, 异补骨脂素诱导的成骨细胞 Runx2 和 Osx 基因以及 ALP 染色高表达呈 BMP2 的依赖性。结论 异补骨脂素可以促进成骨细胞增殖和分化, 并可能通过 BMP2/Runx2/Osx 信号通路而发挥作用。

关键词: 成骨细胞 骨质疏松症 异补骨脂素 植物雌激素 骨形态发生蛋白

doi: 10.11842/wst.20221023005 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

雌激素缺乏是绝经后妇女骨质疏松症 (PMOP) 的首要病因。对 PMOP 的预防可采用雌激素替代疗法, 但长期服用雌激素可明显增加患者发生癌症的危险性^[1-2]。因此, 寻找一种既有效又安全的雌激素类药物是当前本领域的研究热点。大量文献报道, 植物雌激素可促进成骨细胞的增殖和分化, 抑制骨吸收, 诱导骨形成^[3-6]。异补骨脂素属于呋喃香豆素

类化合物, 为植物雌激素之一^[7]。现代药理研究发现, 异补骨脂素具有促进骨代谢的作用, 但其机制尚不清楚^[8-9]。本实验旨在探讨异补骨脂素对成骨细胞增殖和分化的影响, 并利用 BMP2 体外条件性基因敲除技术从基因和蛋白的水平揭示其作用机理, 为异补骨脂素用于临床治疗骨质疏松症提供全面、可靠的实验依据。

收稿日期: 2022-10-23

修回日期: 2022-12-21

* 上海市科学技术委员会中药创新与传承领域项目 (20S21902000): “滋肾阴颗粒”治疗原发性骨质疏松症的临床前研究, 负责人: 唐德志。

** 通讯作者: 唐德志, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向: 中医药防治骨伤科疾病的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞和实验动物

前成骨细胞株 OCT1 细胞和 BMP2^{loxpl/loxp} 小鼠由美国罗切斯特大学骨科系陈棣教授馈赠。

1.1.2 实验药物

异补骨脂素标准品由上海药品检疫局购买,纯度达到 95% 以上;BMP2 纯化蛋白由浙江华东基因技术研究所购买,纯度超过 90%。

1.1.3 实验试剂

胎牛血清(PAA 公司), a-MEM 干粉培养基(CALBIOCHEM 公司), 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶(PAA 公司), 青-链霉素(PAA 公司), G-418 抗体(CALBIOCHEM 公司), 二甲基亚砜 DMSO(SIGMA 公司), MTT(SIGMA 公司), TRIZOL(晶美生物), Quant Reverse Transcriptase 逆转录试剂盒(TIANGEN 公司), 高质纯化 DNA 胶回收试剂盒(GENMEN 公司), 兔抗鼠 Runx2 单克隆抗体, 兔抗鼠 Osx 单克隆抗体, 兔抗鼠 β -actin 单克隆抗体和羊抗兔 HRP 多克隆抗体(Cell signaling 公司), Ad-GFP 和 Ad-Cre 腺病毒(上海吉凯生物公司)等。

1.1.4 实验设备

细胞培养箱(热能公司), SW-CJ-2FD 超净工作台(AIRTECH 公司), 倒置相差显微镜(Olympus 公司), 倒置相差显微镜(Olympus 公司), AF100 制冰机(SCOTMAN 公司), 高速离心机(Eppendorf 公司), MK-III 型酶标仪(Dynex 公司), DU 800/VIS 紫外分光光度计(Beckonman 公司), Rotor Gene 3000 荧光 PCR 仪(基因公司), Odyssey 远红外扫描仪(LI-COR 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞复苏培养

取出装有 OCT1 细胞的冻存管,按常规方法进行细胞活性复苏,计数细胞,按 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于无菌培养瓶中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。次日更换 1 次培养液后再继续培养,以后每 3-4 天换 1 次液。细胞培养液采用含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青-链霉素和 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 G-418 抗体的 a-MEM 培养基。

1.2.2 分组方法

①正常对照组,普通培养液;②异补骨脂素低剂量组,浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;③异补骨脂素中剂量组,浓度为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;④异补骨脂素高剂量组,浓度为

$60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;⑤阳性对照组,BMP2 纯化蛋白 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 MTT 法观察细胞增殖情况

取经常规胰蛋白酶消化后的传代细胞,计数细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。将细胞移入一块 96 孔培养板中,每孔 200 μL ,然后放入 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。培养 24 h 后,更换无血清培养液,使细胞生长同步化。于第 2 天吸去孔内的培养液,按上述分组方法分别给药,每组 8 个复孔,每孔 200 μL 含药无血清细胞培养液。之后,再放入 37°C 5% CO_2 培养箱中继续培养。于培养 48 h 后,取出培养板进行 MTT 法检测。先往每孔加入 20 μL MTT 溶液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),放入 37°C 5% CO_2 培养箱中孵育 4 h 后,弃去上清液,每孔加入 DMSO 180 μL ,充分震荡混匀,使结晶完全溶解,立即上酶标仪测定 OD 值,波长为 490 nm,以同时做的单纯培养液为空白对照孔。

1.2.4 实时荧光定量 RT-PCR 反应

细胞加药培养 48 h 后取出,分别倒尽培养液,采用 TRIzol 法提取细胞总 mRNA。提取后用紫外分光光度计选择波长 260 nm 和 280 nm 检测样本 OD 值(即光吸收值),以超纯水作为空白对照调零,测得样本 A260/A280 比值在 1.8-2.0,证明 RNA 抽提成功,并用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,以检测总 RNA 的完整性。逆转录后进行进行两步法扩增。PCR 反应体系为 20 μL ,扩增仪中 95°C 10 min,再扩增(95°C 变性 20 s, 62°C 退火 5 s, 72°C 复性 25 s) 40 个循环, 72°C 延伸 10 min。制备标准曲线后,用 Rotor Gene 6.0 软件自动进行绝对定量分析,以每一样体所含目的基因的拷贝数和其 β -actin 内参基因的拷贝数的比值表示目的基因的表达量。其引物序列及参照物 β -actin 引物序列由大连宝生物公司合成,引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 检测

细胞加药培养 48 h 后取出,分别倒尽培养液,裂

表 1 Real time RT-PCR 检测所检测的基因引物序列

目的基因	引物序列	扩增产物
β -actin	上游引物 F: 5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'	218 bp
	下游引物 R: 5'-ATGTCACGCACGATTTCC-3'	
BMP2	上游引物 F: 5'-GATCTGTACCCGAGGCACTC-3'	140 bp
	下游引物 R: 5'-TTCCCACTCATCTCTGGAAGTT-3'	
Runx2	上游引物 F: 5'-CATTGCACTGGGTACACGTA-3'	159 bp
	下游引物 R: 5'-GAATCTGGCCATGTTTGTGCTC-3'	
Osx	上游引物 F: 5'-CACCTGCTTACCTGCCTCCT-3'	116 bp
	下游引物 R: 5'-TGCCTGAACATCTCCTCTGCT-3'	

解细胞,提取蛋白并定量。将每组蛋白溶液调整至相同浓度,经煮沸变性后,在SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳。电泳结束后,将凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上,采用5%脱脂奶粉封闭1h,振荡漂洗干净后,分别加入兔抗鼠BMP2、Osx和 β -actin单克隆一抗,4℃过夜。次日取出,振荡漂洗干净后,加入羊抗兔HRP多克隆二抗,孵育1h,振荡漂洗干净后,在Odessey远红外扫描仪上检测蛋白条带,保存图像。

1.2.6 BMP2体外条件性敲除实验

从出生3天的BMP2^{loxP/loxP}小鼠中分离原代颅骨成骨细胞,然后以 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种到六孔培养板上进行培养。利用Ad-GFP或Ad-Cre(病毒滴度: 4×10^8 pfu $\cdot \text{mL}^{-1}$)感染2天后,用或不用异补骨脂素(最佳浓度)分别干预48h,部分细胞用来抽提总RNA,逆转录成cDNA,利用Real-time PCR反应检测BMP2、Runx2和Osterix(Osx)等基因表达,操作方法和步骤同前所述。部分细胞用10%福尔马林固定,加入含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对硝基苯磷酸的AMP缓冲液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基二戊烷,2-丙胺醇,2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁,pH=10.3)染色30 min,直到颜色变化以检测碱性磷酸酶活性。

1.2.7 统计分析

计数指标以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。借助SPSS 11.0软件包,多样本之间进行One-Way ANOVA分析,两两样本之间进行 t 检验。检验水准取双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 形态学观察结果

倒置显微镜下观察,在给药培养48h后,各组细胞的数量及形态与正常组相比均无明显异常。见图1。

2.2 MTT法检测结果

在给药培养48h后(见表2),异补骨脂素能促进成

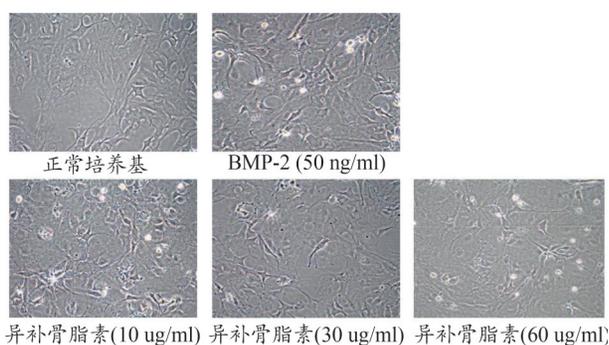


图1 大体观察($\times 10$)

骨细胞的增殖,但以低剂量($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组最明显($P < 0.05$),而中剂量($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组和高剂量($60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组作用不明显($P > 0.05$);阳性对照组BMP2纯化蛋白亦能明显促进成骨细胞的增殖($P < 0.05$)。

2.3 实时荧光定量PCR反应结果

结果显示(见表3),异补骨脂素能促进成骨细胞BMP2 mRNA的表达,以低剂量组($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)最明显($P < 0.05$),中剂量组($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)次之($P < 0.05$);阳性对照组BMP2纯化蛋白亦可以显著增加成骨细胞BMP2 mRNA的表达($P < 0.05$)。异补骨脂素低剂量($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和中剂量($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)能明显促进成骨细胞Runx2 mRNA的表达($P < 0.05$),而高剂量($60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组成骨细胞Runx2 mRNA表达量比正常对照组偏低,但无统计学意义。阳性对照组BMP2纯化蛋白亦可以显著增加成骨细胞BMP2 mRNA的表达($P < 0.05$)。异补骨脂素低剂量组($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和中剂量组($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)能明显促进成骨细胞Osx mRNA的表达($P < 0.05$),而高剂量($60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组成骨细胞Osx mRNA表达量比正常对照组偏低,但无统计学意义。阳性对照组BMP2纯化蛋白亦可以显著增加成骨细胞BMP2 mRNA的表达($P < 0.05$)。

2.4 Western blot检测结果

结果显示(见图2),异补骨脂素低剂量($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和中剂量($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)能增加成骨细胞中Runx2蛋白的表达,分别提高了2.18倍和1.25倍;阳性对照BMP2纯化蛋白也能增加成骨细胞中Runx2蛋

表2 成骨细胞增殖情况

分组	OD值
异补骨脂素低剂量组	0.235 \pm 0.0247*
异补骨脂素中剂量组	0.192 \pm 0.0164
异补骨脂素高剂量组	0.187 \pm 0.0132
BMP2阳性对照组	0.261 \pm 0.0202*
正常阴性对照组	0.178 \pm 0.016

注:与正常对照组比较有显著性差异,* $P < 0.05$ 。

表3 各组BMP2、Runx2、Osx mRNA表达量的比较

分组	BMP2	Runx2	Osx
异补骨脂素低剂量组	14.859 \pm 6.1068*	10.892 \pm 0.247*	5.270 \pm 4.437*
异补骨脂素中剂量组	10.423 \pm 5.043*	9.413 \pm 0.087*	6.556 \pm 1.200*
异补骨脂素高剂量组	1.894 \pm 2.468	0.701 \pm 0.021	0.690 \pm 0.049
BMP2阳性对照组	22.102 \pm 8.765*	14.951 \pm 0.631*	7.141 \pm 3.944*
正常阴性对照组	1.173 \pm 0.117	1.124 \pm 0.207	1.00 \pm 0.007

注:与正常对照组比较有显著性差异,* $P < 0.05$ 。

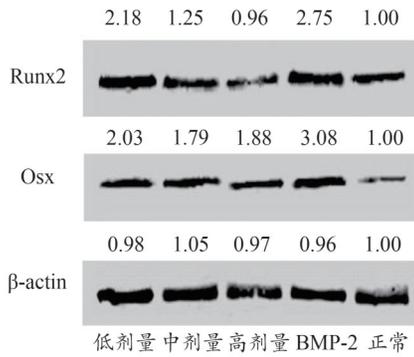


图2 各组Runx2、Osx蛋白表达量的比较

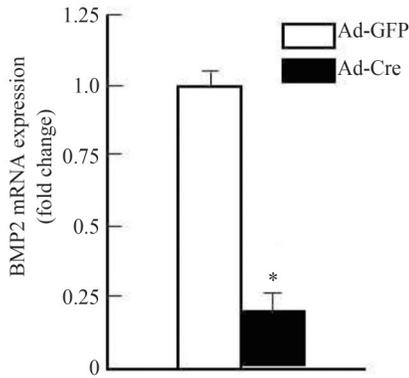


图3 BMP2基因敲除效率

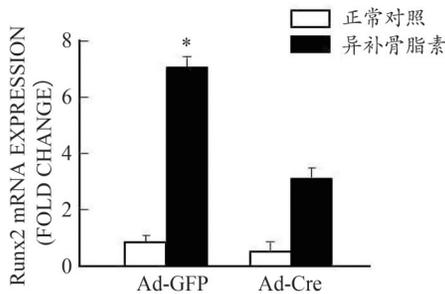


图4 异补骨脂素促进Runx2基因表达部分依赖于BMP2

注:与正常对照+Ad-GFP组比较有显著性差异, * $P<0.05$;与异补骨脂素+Ad-Cre组比较有显著性差异, ** $P<0.05$;与异补骨脂素+Ad-GFP组比较有显著性差异, *** $P<0.05$ 。

白的表达,提高了2.75倍。

异补骨脂素低剂量 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中剂量 ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高剂量 ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)均可提高Osx蛋白的表达量,分别提高了2.03倍、1.79倍和1.88倍;阳性对照BMP2纯化蛋白也能增加成骨细胞中Osx蛋白的表达,提高了3.08倍。

2.5 BMP-2体外条件性敲除实验结果

为进一步研究异补骨脂素诱导成骨细胞分化的作用机理,从Bmp2^{loxP/loxP}小鼠中分离培养颅盖骨成骨细

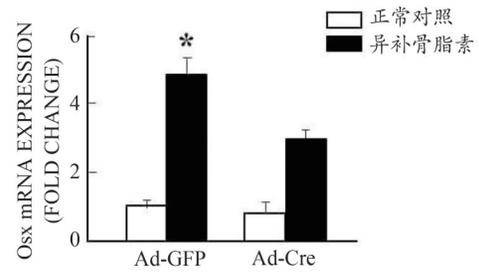


图5 异补骨脂素促进Osx基因表达部分依赖于BMP2

注:与正常对照+Ad-GFP组比较有显著性差异, * $P<0.05$;与异补骨脂素+Ad-Cre组比较有显著性差异, ** $P<0.05$;与异补骨脂素+Ad-GFP组比较有显著性差异, *** $P<0.05$ 。

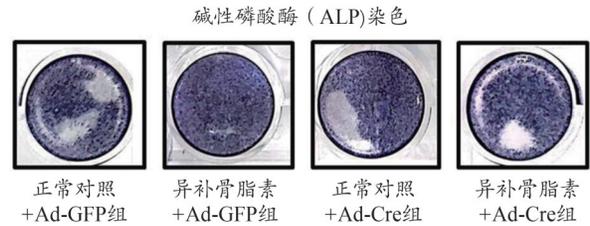


图6 异补骨脂素促进ALP表达部分依赖于BMP2

胞,用Ad-Cre慢病毒体外将BMP2基因敲除(Ad-GFP做为野生型对照)。Real-time PCR反应检测结果显示,经Ad-Cre慢病毒干预后成骨细胞中BMP2的表达显著降低,BMP2基因敲除效率达80%以上,说明BMP2基因敲除成功,如图3所示。之后分别给予最佳浓度 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的异补骨脂素干预,结果发现异补骨脂素可明显促进Ad-GFP处理的野生型对照组成骨细胞中Runx2(图4)和Osx(图5)基因的表达,分别提高了7.2倍和5.9倍。但这种作用在BMP2缺失的成骨细胞中部分消失,仅仅提高了4.6倍和3.2倍。通过碱性磷酸酶(ALP)染色,发现异补骨脂素可明显促进Ad-GFP处理的野生型对照组成骨细胞中ALP染色强表达,而这种作用在BMP2缺失的成骨细胞中部分减弱(图6)。上述结果均表明异补骨脂素促进成骨细胞分化具有BMP2部分依赖性。

3 讨论

成骨细胞在骨代谢的体外研究中非常重要,为研究具有刺激骨形成药物及作用机理提供重要的细胞模型。动物成骨细胞一般来源于胎鼠或新生鼠的颅骨,这些细胞所处的分化时期不同,性质不完全相同^[10]。本实验中,选用的OCT1细胞株是从过表达钙钙素转基因小鼠的颅盖骨中分离获得的成骨细胞,生长旺盛、性质稳定,可以大量满足实验研究的需要^[11]。

中医学认为,肾主骨生髓,一旦肾气衰微,肾精不足,则会发生骨质疏松,正如《素问·痿论》中所说“骨枯髓减,发为骨痿”。肾中精气宜充不宜亏,治疗骨质疏松症以补肾益精为主,代表方剂如肾气丸、左归丸、右归丸等,药物有仙灵脾、补骨脂、熟地、骨碎补、杜仲、枸杞、牛膝等^[12-13]。实验研究发现,这些补肾方药可以提高成骨细胞的增殖率、增加 ALP 活性,因而促进成骨细胞骨形成功能^[14-17]。但对于这些补肾方药中的具有促进成骨细胞增殖的有效组分尚缺乏系统的研究。通过本实验发现,补骨脂中的有效组分异补骨脂素能明显促进成骨细胞的增殖,并以 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度作用最强。

1965年,Urist^[18]发现在脱钙的骨基质中存在一种特殊的蛋白质,能诱导异位成骨,后来就被命名为骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)。迄今为止发现了20多种BMP,除BMP1外,其他BMPs均属于TGF- β 超家族成员,可通过旁分泌和自分泌的形式诱导骨、软骨及与骨有关的结缔组织的形成,还能诱导骨源和非骨源性细胞的成骨分化^[19]。在成骨细胞中,BMPs信号转导途径对骨形成起至关重要的作用。BMP2被认为是TGF- β 超家族中活性最高且能单独诱导成骨的因子,其高表达可以促进成骨细胞的分化^[20-21]。通过本实验发现,异补骨脂素能促进BMP2的表达,从而诱导成骨,并以低剂量($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及中剂量($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用较强,而高剂量($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用较弱。

Runx2属于Runt结构域基因家族成员,是与BMPs信号转导的下游分子Smad1和Smad5相互作用,从而调节成骨细胞的分化^[22-24]。在没有BMP2作用时,Runx2单独表达虽然能抑制成肌细胞分化,但不能上调骨钙素的表达,而在BMP2作用下,过表达Runx2诱导产生的骨钙素水平高于BMP-2的单独作用,说明BMP2和Runx2具有协同作用。以上结果均表明

Runx2在BMP-2激活成骨的信号途径中起了非常重要的作用^[25-26]。Runx2是成骨细胞分化所必需的关键转录因子,可协同其下游的Osx调节成骨细胞特异性基因的表达,从而影响成骨细胞分化^[27-28]。通过本实验,发现异补骨脂素可以诱导Runx2 mRNA和Osx mRNA的高表达,并以低剂量($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和中剂量($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用最强。

条件性基因敲除(Conditional gene knockout)是指为将某个基因的修饰限制于小鼠某些特定类型的细胞或发育的某一特定阶段的一种特殊的基因敲除方法^[29]。实际上是在常规的基因敲除的基础上,利用重组酶介导的位点特异性重组技术,在对小鼠基因修饰的时空范围上设置一个可调控的“按钮”,从而使对小鼠基因组的修饰的范围和时间处于一种可控状态。目前广泛应用方法就是利用Cre/LoxP重组酶系统来研究小鼠特定组织器官或特定细胞中靶基因灭活所导致的表型。Cre重组酶是一种位点特异性重组酶,能识别并介导两个LoxP位点(序列)之间的特异性重组,使LoxP位点间的基因序列被删除或重组^[30]。如果将“LoxP Floxed”小鼠的细胞转染病毒介导的Cre重组酶,可产生靶基因发生特定方式修饰的条件性敲除细胞,这是一种体外条件性基因敲除方法。在“LoxP Floxed”小鼠或细胞,正常情况下同野生型的一样,只有遇到Cre重组酶时才会导致靶基因的突变^[31]。本实验为进一步验证异补骨脂素通过介导BMP2增加Runx2和Osx表达而诱导成骨细胞分化的作用机理,从BMP2^{loxP/loxP}小鼠中分离培养颅盖骨成骨细胞,用Ad-Cre慢病毒体外将BMP2基因敲除,然后给予低剂量($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)异补骨脂素干预,发现异补骨脂素诱导的Runx2和Osx高表达呈BMP2的依赖性。因此,本实验结果首次证明了异补骨脂素通过促进BMP2/Runx2/Osx信号通路的激活,从而诱导成骨细胞分化。

参考文献

- 1 Pan M J, Pan X Y, Zhou J, et al. Update on hormone therapy for the management of postmenopausal women. *Biosci Trends*, 2022, 16(1): 46-57.
- 2 Słupski W, Jawień P, Nowak B. Botanicals in postmenopausal osteoporosis. *Nutrients*, 2021, 13(5):1609.
- 3 顾建忠, 李海. 植物性雌激素防治绝经后妇女骨质疏松症的研究进展. *右江医学*, 2020, 48(3):229-232.
- 4 梅杰, 何强, 孙欣, 等. 淫羊藿苷促进成骨细胞增殖分化的非核效应信号通路. *中国组织工程研究*, 2023, 27(20):3129-3135.
- 5 平凡, 朱琳, 沈霞, 等. 基于炎症因子、雌激素及骨稳态的多向调控研究肉桂-熟地黄防治骨质疏松的分子作用机制. *药学学报*, 2022, 57(12):3644-3652.

- 6 张敏, 张晓明, 刘童斌. 柚皮苷在骨组织再生领域的应用潜力. 中国组织工程研究, 2023, 27(5):787-792.
- 7 王婷. 某些植物雌激素与 ER_{α} 及 ER_{β} 蛋白相互作用的分子动力学研究. 烟台: 烟台大学硕士学位论文, 2020.
- 8 刘锐, 杨小杰, 李鑫, 等. 异补骨脂素对去卵巢大鼠骨代谢的影响研究. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(6):807-811.
- 9 李想, 王剑, 岑利民, 等. 异补骨脂素影响骨代谢研究进展及其药物安全性. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(11):1637-1640.
- 10 胡泽兵, 王冰, 曹新生, 等. 骨质疏松动物及细胞学研究模型的建立与评价. 解放军医学院学报, 2013, 34(7):789-791.
- 11 Di C, Hong C, Jian Q F, et al. Osteoblastic cell lines derived from a transgenic mouse containing the osteocalcin promoter driving SV40 T-antigen. *Mol Cell Biol*, 1995, 3(3):193-212.
- 12 刘佩, 梁润英. 中医药防治原发性骨质疏松症研究进展. 中医学报, 2022, 37(10):2122-2130.
- 13 匡浩铭, 杨张琪, 匡建军, 等. 基于古今医案云平台分析中医治疗骨质疏松症的治疗规律. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(10):1757-1761.
- 14 朱飞鹏. 中医药防治骨质疏松症研究进展. 中国自然医学杂志, 2002, 2:94-96.
- 15 许航, 孟林, 李宏宇. 淫羊藿苷对成骨细胞促进作用的机制. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(03):425-429.
- 16 高文鑫, 陈云刚, 姚康, 等. 骨碎补治疗骨质疏松症的实验研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(11):1683-1689.
- 17 王绪平, 张扬, 黄孝闻, 等. 补肾健骨类中药活性成分对高糖诱导成骨细胞的保护作用及机制研究. 浙江中医杂志, 2021, 56(4):241-244.
- 18 Urist M R. Bone: Formation by autoinduction. *Science*, 1965, 150(3698):893-899.
- 19 Lowery J W, Rosen V. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton. *Physiol Rev*, 2018, 98(4):2431-2452.
- 20 王茸影, 易静. 骨形成蛋白调控成骨分化的信号机制. 生命科学, 2005, 17(1):34-39.
- 21 Xu Y M, Yang Y, Hua Z Y, et al. BMP2 immune complexes promote new bone formation by facilitating the direct contact between osteoclasts and osteoblasts. *Biomaterials*, 2021, 275:120890.
- 22 Kundu M, Javed A, Jeon J P, et al. Cbfb interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nat Genet*, 2002, 32(4):639-644.
- 23 Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7):1694.
- 24 Liu D D, Zhang C Y, Liu Y, et al. RUNX2 regulates osteoblast differentiation via the BMP4 signaling pathway. *J Dent Res*, 2022, 101(10):1227-1237.
- 25 唐德志, 王拥军, 施杞. 调控骨形态发生蛋白诱导成骨的相关转录因子. 脊柱外科杂志, 2006, 4(6):377-380.
- 26 Yu S T, Guo J Q, Sun Z Y, et al. BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation. *Cell Death Dis*, 2021, 12:197.
- 27 訾慧, 郑洪新, 蒋宁, 等. 淫羊藿素通过 BMP/Runx2/Osx 信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化研究. 中华中医药学刊, 2020, 38(7):212-215.
- 28 Shrivats A R, Hsu E, Averick S, et al. Cationic nanogel-mediated Runx2 and osterix siRNA delivery decreases mineralization in MC3T3 cells. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(6):2139-2149.
- 29 Brown A J, Fisher D A, Kouranova E, et al. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing. *Nat Methods*, 2013, 10(7):638-640.
- 30 K R, H G, R K, et al. Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, 1996, 98(3):1.
- 31 Le Y, Sauer B. Conditional gene knockout using cre recombinase. *Methods Mol Biol*, 2000, 136:477-485.

Isopsoralen Promotes Osteoblast Proliferation and Differentiation via BMP2/Runx2/Osx Signaling Pathway

Zhang Youwei¹, Huang Chen², Huang Tingrui², Tang Dezhi²

(1. Centre Hospital of Baoji, Baoji 721008, China; 2. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective The purpose of this study was to examine effects of Isopsoralen on the osteoblast proliferation and differentiation and find its possible molecular mechanisms for anti-osteoporosis. Methods OCT-1 cells were cultured with common methods. While growing well, cells were cultured with 3 doses ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of Isopsoralen for 48 h, or with purified bone morphogenetic protein 2 (BMP2) protein ($50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). We first determined the effect of Isopsoralen on cell proliferation by MTT assay. The real time RT-PCR was also used to quantify changes in the mRNA levels of several genes, such as BMP2, Runt-related transcription factor 2 (Runx2), and Osterix (Osx). We

also used the Western blot analysis to evaluate the expression of Runx2 and Osx proteins. At last we used the BMP2^{loxp/loxp} mice to isolate the primary calvaria osteoblasts, cultured with Isopsoralen of the best dose for 48 h after the *in vitro* conditional gene knockout technology, and tested the gene expressions of Runx2 and Osx. And the alkaline Phosphatase (ALP) staining was also performed. Result Isopsoralen (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) can promote osteoblast proliferation obviously. From the real time RT-PCR analysis, Isopsoralen can enhance the BMP2 mRNA levels, the effect of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was the best, and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ followed. In addition, we found that Isopsoralen (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) can enhance the Runx2 mRNA levels significantly. We also found that lower doses of Isopsoralen can enhance the Osx mRNA levels, the effect of 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was the best, and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ followed. From the Western blot analysis, low doses of Isopsoralen (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) can stimulate the expression of Runx2 protein. Besides, three doses of Isopsoralen can stimulate the expression of Osx protein, and the effect of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ are better. Finally, the results of *in vitro* conditional gene knockout experiment showed that the overexpression of Runx2 and Osx genes in osteoblasts, as well as ALP staining, induced by Isopsoralen are BMP2 dependent. Conclusions In this study, we firstly demonstrate that Isopsoralen can stimulate osteoblast proliferation and differentiation by mediating BMP2 /Runx2/Osx signaling pathway.

Keywords: Osteoporosis, Osteoblast, Isopsoralen, Plant estrogen, BMP2

(责任编辑: 刘玥辰)