doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.03.001

## ・基础研究・

## 川续断提取皂甙促进骨质疏松模型中骨髓基质细胞成骨分化的 作用机制研究\*

许勇1.2 谢贤斐1 薛彬1 熊焱昊1 江敏2

(1上海交通大学医学院附属瑞金医院骨伤科 上海 200025;2 上海市伤骨科研究所骨与关节损伤重点实验室 上海 200025)

摘要 目的:探讨川续断提取皂甙(ASA)促进骨质疏松模型中骨髓基质细胞(rBMSCs)成骨分化的作用机制。方法:选取3月龄的 雌性 SD 大鼠 60 只,随机分为卵巢切除组和假手术组,每组 30 只。采取卵巢切除法构建骨质疏松模型。建模成功后采用微型计算 机断层扫描获得其松质骨微观结构的三维图像并进行分析。采用 CCK-8 法测定 ASA 对卵巢切除组 rBMSCs 增殖的影响。分析碱 性磷酸酶(ALP)活性;荧光定量 PCR 检测成骨基因 ALP、骨桥蛋白(OPN)、Runt 相关转录因子 2(RUNX2)的表达情况;蛋白免疫 印迹试验检测磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)蛋白表达情况。结果:与假手术组比较、卵巢切除组骨小梁数 量、骨小梁厚度和骨体积分数下降,但骨小梁分离度升高,差异有统计学意义(P<0.05)。第4天和第7天,ASA(10<sup>5</sup> mol/L)组、 ASA(10<sup>6</sup> mol/L)组、ASA(10<sup>7</sup> mol/L)组和 ASA(10<sup>8</sup> mol/L)组 rBMSC 增殖均显著高于 ASA(0 学艺术 mol/L)组,以 ASA(10<sup>5</sup> mol/L) 最为显著;而 ASA(10<sup>-1</sup> mol/L)组、ASA(10<sup>-2</sup> mol/L)组、ASA(10<sup>-3</sup> mol/L)组和 ASA(10<sup>-4</sup> mol/L)组 rBMSC 增殖显著低于 ASA (0 mol/L)组,以 ASA(10<sup>4</sup> mol/L)最为显著,差异均有统计学意义(P<0.05)。第7天和第14天,ASA(10<sup>5</sup> mol/L)组、ASA(10<sup>6</sup> mol/L) 组、ASA(10<sup>-7</sup> mol/L)组和 ASA(10<sup>\*</sup> mol/L)组 ALP 活性均显著高于 ASA(0 mol/L)组,且第 14 天 ALP 活性高于第 7 天,差异均有 统计学意义(P<0.05)。与对照组比较, ASA 组成骨相关基因 ALP、OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平显著升高, 差异有统计 学意义(P<0.05);与 ASA 组比较, wortmannin 组成骨相关基因 ALP、OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平均显著降低, 差异有 统计学意义(P<0.05)。与对照组比较, ASA 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著升高, 差异有统计学意义(P<0.05); 与 ASA 组比 较,wortmannin 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论:ASA 能促进骨质疏松模型 rBM-SCs 增殖, 增强 ALP 活性, 增强 ALP、OPN 和 RUNX2 的表达, 而 PI3K 通路抑制剂 wortmannin 降低了这些成骨作用, 并降低了 ASA 诱导的 PI3K、p-AKT 水平,表明 ASA 通过 PI3K/AKT 信号通路促进骨质疏松模型 rBMSCs 成骨分化。

关键词:川续断提取皂甙;骨质疏松;骨髓基质细胞;PI3K;AKT;成骨分化

中图分类号:R-33;R68;R243 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)03-401-06

# Study on the Mechanism of Asperosaponin in Promoting Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells in Osteoporosis Model\*

XU Yong<sup>1,2</sup>, XIE Xian-fei<sup>1</sup>, XUE Bin<sup>1</sup>, XIONG Yan-hao<sup>1</sup>, JIANG Min<sup>2</sup>

(1 Department of Orthopedics and Traumatology, Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200025, China; 2 Key Laboratory of Bone and Joint Injury, Shanghai Institute of Orthopedics and Traumatology,

Shanghai, 200025, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the mechanism of asperosaponin (ASA) in promoting osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells (rBMSCs) in osteoporosis model. **Methods:** 60 female SD rats aged 3 months were selected and randomly divided into ovariectomized group and sham operation group, with 30 rats in each group. The ovariectomy method was used to construct an osteoporosis model. After the modeling was successful, the microcomputer tomography was used to obtain the three-dimensional image of the microstructure of the cancellous bone and analyzed. The CCK-8 method was used to determine the effect of ASA on the proliferation of rBMSCs in the ovariectomized group. Analyzed the alkaline phosphatase (ALP) activity, and fluorescent quantitative PCR to detect the expression of osteogenic genes ALP, osteopontin (OPN), Runt-related transcription factor 2(RUNX2). Western blotting was used to detect the expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phosphorylated protein kinase B (p-AKT). **Results:** Compared with the sham operation group, the trabeculae number, trabecular thickness and bone volume fraction in the ovariectomized group decreased, but the trabecular separation increased, and the difference were statistically significant(P<0.05). On 4 d and 7 d, the proliferation of rBMSCs in the ASA (10<sup>-6</sup> mol/L) group, ASA (10<sup>-7</sup> mol/L) group and ASA (10<sup>-8</sup> mol/L) group were all significantly higher

<sup>\*</sup>基金项目:上海市卫计委科研项目(20134211)

作者简介:许勇(1975-),男,博士,副主任医师,研究方向:代谢性及退行性骨病,E-mail: xuyong11355@163.com (收稿日期:2021-06-05 接受日期:2021-06-28)

than the ASA (0 mol/L) group, with ASA ( $10^{5}$  mol/L) being the most significant; while the ASA ( $10^{-1}$  mol/L) group, ASA ( $10^{-2}$  mol/L) group, and ASA ( $10^{-3}$  mol/L) group and the ASA ( $10^{-4}$  mol/L) group was significantly lower than that in the ASA (0 mol/L) group, with ASA ( $10^{-4}$  mol/L) group, ASA ( $10^{-6}$  mol/L) group, ASA ( $10^{-7}$  mol/L) group and ASA ( $10^{-8}$  mol/L) group were all significantly higher than the ASA (0 mol/L) group, and the ALP activity on 14 d was higher than that on 7 d, the difference were statistically significant (P<0. 05). Compared with the control group, the relative mRNA expression levels of the bone-related genes ALP, OPN and RUNX2 of ASA group increased significantly, and the difference were statistically significant (P<0. 05); compared with the ASA group, the relative mR-NA expression levels of the bone-related genes ALP, OPN and RUNX2 of wortmannin group were significantly reduced, and the difference were statistically significant (P<0. 05). Compared with the control group. Compared with the control group, the relative mR-NA expression levels of PI3K and p-AKT protein in the ASA group were significantly increased, and the difference were statistically significant (P<0. 05); compared with the ASA group, the expression levels of PI3K and p-AKT protein in the wortmannin group were significantly reduced, and the differences were statistically significant (P<0. 05). Conclusion: ASA can promote the proliferation of osteoporosis model rBMSCs, enhance the activity of ALP, and enhance the expression of ALP, OPN and RUNX2. The PI3K pathway inhibitor wortmannin reduce these osteogenic effects and reduce the levels of PI3K and p-AKT induced by ASA. ASA promotes osteogenic differentiation of osteoporosis model rBMSCs through PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Asperosaponin; Osteoporosis; Rat bone marrow stromal cells; PI3K; AKT; Osteogenic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R68; R243 Document code: A Article ID: 1673-6273(2022)03-401-06

## 前言

骨质疏松是以骨量减少、骨质微观结构破坏、骨脆性增加、 易骨折为特征的全身性骨病,分为原发性和继发性两大类,与 年龄增长密切相关[1-3]。骨髓基质细胞(rBMSCs)产生成骨细胞, 成骨细胞可以形成新的骨组织,在老年人群中,rBMSCs的成 骨分化减少,导致骨形成明显减少[40]。因此 rBMSCs 成骨分化 能力下降可能是老年性骨质疏松发生的病因,促进 rBMSCs 的 增殖和成骨分化是制定骨质疏松治疗策略的关键。马丹四的研 究显示,川续断提取皂甙(ASA)能显著促进人牙周膜干细胞的 增殖和成骨分化,G蛋白耦联受体 30(GPR30)和 Hippo/转录 共激活因子 PDZ 结合基序(TAZ)信号通路参与了 ASA 促进 人牙周膜干细胞的成骨分化,GPR30 介导了 Hippo/TAZ 信息 通路在 ASA 促进人牙周膜干细胞成骨分化过程中的作用。 Niu Y 等<sup>18</sup>发现 ASA 对 MC3T3-E1 细胞和原代成骨细胞具有 显著的增殖、分化和矿化作用,诱导成骨细胞分化与骨形态发 生蛋白 2(BMP-2)的增加,并可能通过增加 p38 和 ERK1/2 的 活性来诱导分化;表明 ASA 可诱导成骨细胞成熟分化,通过增 加 BMP-2 合成, 激活 p38 和 ERK1/2 来促进骨形成。磷脂酰肌 醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路在 rBMSCs 的存 活、增殖、迁移和分化中发挥调控作用,体内和体外研究均表明 PI3K/AKT 信号通路参与了骨质疏松的抑制<sup>[9,10]</sup>。因此,本研究 探讨 ASA 促进骨质疏松模型中骨髓基质细胞成骨分化的作用 机制。

## 1 材料与方法

#### 1.1 药物和试剂

川续断提取皂甙(ASA)购于南京世洲生物科技有限公司, 纯度>98%,溶解在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,密封后在-20℃ 避光保存。大鼠购于瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司。杜尔 贝科改良老鹰培养基(DMEM)和胎牛血清(FBS)购自北京诺 博莱德科技有限公司。CCK-8 试剂盒购于上海经科化学科技有 限公司。二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒购于上海炎熙生物 科技有限公司。碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒购于上海博 湖生物科技有限公司。wortmannin(一种能够阻断 PI3K 信号传 导通路的蛋白激酶抑制剂)购于碧云天生物工程研究所(中国 上海)。抗坏血酸磷酸盐、β-甘油磷酸盐、地塞米松购自北京诺 博莱德科技有限公司。

### 1.2 实验动物和建模

3 月龄的雌性 SD 大鼠 60 只,体重 240-260 g,平均 (251.0±3.5)g。60 只大鼠随机分为卵巢切除组和假手术组,每 组 30 只。采取卵巢切除法构建骨质疏松模型<sup>[11]</sup>。腹腔注射每公 斤体重 300 mg 水合氯醛后,对大鼠进行卵巢切除即可获得卵 巢切除组;而假手术组不切除卵巢,以卵巢周围部分脂肪代替, 其他手术操作相同即可获得假手术组。然后将所有大鼠置于室 温 23℃、湿度 55%的笼子中喂养,光照/黑暗周期为 12 h。

#### 1.3 微型计算机断层扫描

所有大鼠喂养 12 周后,取 10 只大鼠股骨(每组 5 只),用 微型计算机断层扫描获得其松质骨微观结构的三维图像并进 行分析。样本参数包括骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度 和骨体积分数。

#### 1.4 细胞培养

过量水合氯醛处死 40 只大鼠,每组 20 只,获得骨髓基质 细胞(rBMSCs)进行培养。摘除大鼠胫骨和股骨,并在无菌条件 下小心地摘除所有附着的组织。用含 10% FBS 的 DMEM 注射 液、青霉素 100 U/mL、链霉素 100  $\mu$ g/mL 提取骨髓。将细胞置 于直径 60 mm 的板上,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的潮湿环境中培养 24 h, 然后第一次更换培养基。在 85%的浓度下,将细胞胰蛋白酶化 (0.25%胰蛋白酶),并按 1:3 的比例传代到烧瓶中。所有实验均 采用第三代 rBMSCs。除细胞增殖实验外,其余所有后续实验 中,在培养基添加 10 mM β-甘油磷酸盐、50  $\mu$ g/mL 抗坏血酸 和 10<sup>\*</sup> mol/L 地塞米松的成骨培养基取代。

#### 1.5 细胞增殖实验

卵巢切除组 rBMSCs 以 2×10<sup>3</sup> 个细胞 / 孔的密度接种于 96 孔板,含不同浓度的 DMEM 和 ASA(0、10<sup>-1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> 和 10<sup>8</sup> mol/L),每个浓度有 6 个重复孔。分别在第 1 天、第 4 天、第 7 天加入 10 μL/孔的 CCK-8 溶液。然后将细 胞置于 37℃的黑暗中培养 1 h。摇动 10s 后,测定 450 nm 处的 吸光度。

#### 1.6 ALP 活性检测

卵巢切除组 rBMSCs 与不同浓度的 ASA(0、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> 和 10<sup>8</sup> mol/L)—起接种于 24 孔板(5× 10<sup>3</sup> 个细胞/孔),每个浓度设 3 个重复孔。成骨诱导 7 或 14 天后,用 0.2%聚乙二醇辛基苯基醚冰裂解细胞,4℃ 14000 rpm 离心 15 min。收集上清,用 ALP 活性试剂盒测定 ALP 活性。ALP 活性比值为不同浓度ASA 所得 ALP 活性与 ASA(0 mol/L) 组 ALP 活性的比值。

#### 1.7 荧光定量 PCR 检测

荧光定量 PCR 检测成骨分化相关标志基因[ALP、骨桥蛋 白(OPN)、Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)]的表达水平。卵巢 切除组 rBMSCs 接种于 6 孔板(4×10<sup>4</sup>个细胞/孔)中,培养于 含 ASA(10<sup>5</sup> mol/L)和/或 wortmannin (50 μM)的成骨培养基 中,每个浓度有 3 个重复孔。成骨诱导 48 h 后,按照试剂盒说 明,用 Trizol 试剂提取总 RNA。在样品中加入脱氧核糖核酸酶 I 以消除任何 DNA 污染。然后将 RNA 样本用 cDNA 反转录试 剂盒对 ALP、OPN 和 RUNX2 合成 cDNA,并将数据归一化至

#### GAPDH

#### 1.8 蛋白免疫印迹试验

获得的卵巢切除组 rBMSCs 在成骨诱导条件下培养 2 天。 然后用 PBS 洗涤 3 次,用 RIPA 缓冲液在冰上裂解,12000×g 离心 5 min。收集上清液,用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓 度;每个样品 50 μg 蛋白质煮沸 5 min,然后 SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜。用 5% BSA 在 TBST 缓冲液中堵塞细胞膜, 随后与抗 PI3K 和 p-AKT 一抗在 4℃下孵育过夜。然后在 TB-ST 中洗涤 3 次,15 min,与二抗(1:3000)在室温下孵育 30 min。 使用增强化学发光可视化后,测定了实验波段吸收值相对于 β-actin 的吸收值。

## 1.9 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件。所有实验至少重复三次,多 组间比较采用单因素方差分析。计量资料采用均数±标准差 (x±s)表示及t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 微型计算机断层扫描评估

微型计算机断层扫描三维图像显示,与假手术组比较,卵 巢切除组股骨微观结构损伤严重,骨小梁稀疏。与假手术组比 较,卵巢切除组骨小梁数量、骨小梁厚度和骨体积分数下降,但 骨小梁分离度升高,差异有统计学意义(P<0.05),见表1。

#### 表1 微型计算机断层扫描松质骨微观结构参数

Table 1	Microstructure	parameters	of cancel	lous bone	by microcom	puter tomography	
r uore r	10110105tl dettale	parameters	or cancer.	loub cone	oy microcom	pater tomography	

Groups	Trabeculae number( 1/mm )	Trabecular thickness( mm )	Trabecular separation(mm)	Bone volume fraction(%)
Sham operation group	4.36± 0.17	$0.33 \pm 0.01$	$0.28 \pm 0.02$	37.2± 3.1
Ovariectomized group	3.52± 0.11	0.24± 0.02	0.36± 0.02	14.1± 2.0
T value	10.634	8.947	9.614	57.016
P value	0.005	0.010	0.008	0.000

## 2.2 rBMSC 增殖情况

第1天观察不同浓度 ASA 对卵巢切除组 rBMSC 增殖的 影响,组间比较差异无统计学意义(P > 0.05),提示第1天 ASA 对 rBMSC 增殖无影响。在第4天和第7天,ASA ( $10^5 \text{ mol/L}$ ) 组、ASA( $10^6 \text{ mol/L}$ )组、ASA( $10^7 \text{ mol/L}$ )组和 ASA( $10^8 \text{ mol/L}$ ) 组 rBMSC 增殖均显著高于 ASA (0 mol/L)组和 ASA( $10^1 \text{ mol/L}$ )组、ASA( $10^2 \text{ mol/L}$ )组、ASA( $10^3 \text{ mol/L}$ )组和 ASA( $10^4 \text{ mol/L}$ )组 rBMSC 增殖显著低于 ASA(0 mol/L)组和 ASA( $10^4 \text{ mol/L}$ )组 rBMSC 增殖显著低于 ASA(0 mol/L)组,差异均有统 计学意义(P < 0.05)。提示 ASA( $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7 和 10^8 \text{ mol/L}$ )以 剂量依赖性方式促进卵巢切除组 rBMSC 的增殖,以 ASA( $10^5 \text{ mol/L}$ )與抑制 rBMSC 增殖,以 ASA( $10^4 \text{ mol/L}$ )最为显著,而 ASA( $10^4 \text{ mol/L}$ )最为显著,见表 2。

#### 2.3 ALP 活性检测

第7天和第14天,ASA(10<sup>s</sup> mol/L)组、ASA(10<sup>s</sup> mol/L)组、 ASA(10<sup>-7</sup> mol/L)组和 ASA(10<sup>s</sup> mol/L)组 ALP 活性均显著高于 ASA(0 mol/L)组,且第14天 ALP 活性高于第7天,差异均有统 计学意义(*P*<0.05)。提示不同浓度 ASA 中 ALP 的活性均增 加,其中 ASA(10<sup>5</sup> mol/L) 组 ALP 活性增加最显著,见表 3。表明 ASA(10<sup>5</sup> mol/L)是刺激卵巢切除组 rBMSC 成骨分化的最佳浓度。因此,后续实验中采用了该浓度。

## 2.4 成骨相关基因 mRNA 表达水平

与对照组比较,ASA 组成骨相关基因 ALP、OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义 (P<0.05); 而 wortmannin 组成骨相关基因 ALP、OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平变化不大,差异无统计学意义 (P>0.05)。与 ASA 组比较,wortmannin 组成骨相关基因 ALP、 OPN 和 RUNX2 相对 mRNA 表达水平均显著降低,差异有统 计学意义(P<0.05),见表 4。表明 ASA 治疗显著提高了卵巢切 除组 rBMSCs 成骨基因的表达,而 PI3K 通路抑制剂 wortmannin 则干扰 ASA 诱导的卵巢切除组 rBMSCs 成骨基因表达。

## 2.5 PI3K、p-AKT 蛋白表达

与对照组比较,ASA 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义 (P<0.05); 而 wortmannin 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平变化不大,差异无统计学意义(P>0.05)。

与 ASA 组比较,wortmannin 组 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显 著降低,差异均有统计学意义(P<0.05),见表 5,图 1。提示 ASA 治疗显著上调了 PI3K、p-AKT 的表达,而 wortmannin 下 调了 PI3K、p-AKT 的表达,表明 ASA 通过激活 PI3K/AKT 通路刺激卵巢切除组 rBMSCs 成骨分化。

Comme	OD value			
Groups —	1 d	4 d	7 d	
ASA(0 mol/L) group	0.75± 0.08	1.12± 0.10	1.63± 0.17	
ASA(10 <sup>-1</sup> mol/L) group	0.66± 0.07	0.72± 0.10 <sup>&amp;</sup>	0.83± 0.12 <sup>&amp;</sup>	
ASA(10 <sup>-2</sup> mol/L) group	0.71± 0.08	0.69± 0.08 <sup>&amp;</sup>	0.92± 0.15 <sup>&amp;</sup>	
ASA(10 <sup>-3</sup> mol/L) group	$0.68 \pm 0.08$	$0.58 \pm 0.07^{\&}$	0.79± 0.14 <sup>&amp;</sup>	
ASA(10 <sup>4</sup> mol/L) group	0.54± 0.06	0.49± 0.05 <sup>&amp;</sup>	0.35± 0.04 <sup>&amp;</sup>	
ASA(10 <sup>-5</sup> mol/L) group	$0.76\pm 0.08$	2.16± 0.23 <sup>&amp;</sup>	2.54± 0.25 <sup>&amp;</sup>	
ASA(10 <sup>-6</sup> mol/L) group	$0.73 \pm 0.08$	1.97± 0.15 <sup>&amp;</sup>	2.44± 0.24 <sup>&amp;</sup>	
ASA(10 <sup>-7</sup> mol/L) group	$0.67 \pm 0.07$	1.88± 0.14 <sup>&amp;</sup>	2.36± 0.23*	
ASA(10 <sup>-8</sup> mol/L) group	0.64± 0.06	1.65± 0.13 <sup>&amp;</sup>	2.18± 0.20 <sup>&amp;</sup>	
F value	0.967	37.261	29.641	
P value	1.063	0.000	0.000	

表 2 第 1 天、第 4 天、第 7 天观察 ASA 对卵巢切除组 rBMSCs 增殖的影响

Table 2 Effects of ASA on rBMSCs proliferation in ovariectomized group on 1 d, 4 d and 7 d

Note: Compared with ASA(0 mol/L) group, &P<0.05.

<b>表</b> 3	笙 7	天 笙	14 7	ALP	活性检测
AX J	<b>퐈</b> /	八、乐	14 八	ALI	/ 11/11/11/11/11

Table 3 ALP activity test on 7 d and 14 d

Crowns	ALP activity ratio		
Groups —	7 d	14 d	
ASA(0 mol/L) group	1.00± 0.01	1.00± 0.01	
ASA(10 <sup>-5</sup> mol/L) group	1.82± 0.22*	2.49± 0.32**	
ASA(10 <sup>-6</sup> mol/L) group	1.69± 0.20*	2.03± 0.30**	
ASA(10 <sup>-7</sup> mol/L) group	1.53± 0.17 <sup>&amp;</sup>	1.85± 0.24**	
ASA(10 <sup>-8</sup> mol/L) group	1.44± 0.15 <sup>&amp;</sup>	1.73± 0.21**	
F value	24.063	43.063	
<i>P</i> value	0.000	0.000	

Note: Compared with ASA(0 mol/L) group, & P<0.05; Compared with the same group on 7 d, \*P<0.05.

## 表 4 成骨相关基因 mRNA 表达水平

Table 4 mRNA expression levels of osteogenesis related genes

Groups	ALP	OPN	RUNX2
Control group	$1.00 \pm 0.01$	1.00± 0.01	1.00± 0.01
ASA group	2.76± 0.38 <sup>&amp;</sup>	4.31± 0.62 <sup>&amp;</sup>	2.78± 0.42 <sup>&amp;</sup>
Wortmannin group	1.20± 0.13*	2.00± 0.36*	$0.88 \pm 0.08 *$
F value	36.095	22.085	30.691
<i>P</i> value	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with control group,  $^{\&}P \le 0.05$ ; Compared with ASA group,  $^{*}P \le 0.05$ .

骨质疏松最严重的后果是导致骨质疏松性骨折,造成疼痛 和重度伤残,并降低预期寿命,长期卧床者1年内致死率达

1	Table 5 Expression of PI3K and p-AKT proteins	
Groups	PI3K	p-AKT
Control group	1.00± 0.01	0.60± 0.01
ASA group	2.35± 0.27 <sup>&amp;</sup>	1.26± 0.14*
wortmannin group	1.18± 0.12*	0.51± 0.08*
F value	9.561	6.534
<i>P</i> value	0.005	0.037

表 5 PI3K、p-AKT 蛋白表达

Note: Compared with control group, \*P<0.05; Compared with ASA group, \*P<0.05.





20%,永久性致残率达 50%[12-14]。因此骨质疏松的预防和治疗受 到越来越多的关注。目前治疗骨质疏松的药物主要有骨吸收抑 制剂,通过抑制破骨细胞的功能来维持骨量,但这类药物在增 加或恢复骨量方面的作用相对温和,迫切需要一种令人满意的 合成代谢治疗方法,即增强骨形成[15,16]。本研究旨在探讨 ASA 是否具有促进骨质疏松成骨分化的作用及其作用机制。通过对 大鼠采取卵巢切除法构建骨质疏松模型,微型计算机断层扫描 结果显示卵巢切除组股骨微观结构损伤严重,骨小梁稀疏,同 时骨小梁数量、骨小梁厚度和骨体积分数下降,但骨小梁分离 度升高,提示骨质疏松模型建模成功。

续断属续断科,是一种多年生草本植物,生长在潮湿的田 野和山区,在我国长期被用作抗骨质疏松、滋补和抗衰老的药 物,用于治疗腰痛、外伤性血肿,先兆流产和骨折[17,18]。续断提取 物可预防模拟微重力和卵巢切除所致的大鼠骨丢失19。此外, 续断总皂苷通过骨形态发生蛋白 -2/ 丝裂原活化蛋白激酶 /SMAD1/5/8 依赖性 RUNX2 信号通路诱导成骨细胞分化<sup>[20]</sup>。 ASA 是从续断中分离出来的主要活性成分,又称为木通皂苷 D,体外研究表明 ASA 能促进骨生成和骨形成,具有抗骨质疏 松的作用<sup>[21]</sup>。Liu K 等<sup>[22]</sup>证实 ASA 通过抑制核因子 -κB 受体活 化因子配体(RANKL)诱导的破骨细胞分化和功能,在体内外 发挥其抗破骨活性,表明 ASA 在预防或抑制 RANKL 介导的 骨溶解性疾病方面具有潜在的治疗作用。Fang Y<sup>[23]</sup>等研究发 现,中药黄芪的提取物毛蕊异黄酮在成骨作用部分涉及 IGF1R/PI3K/AKT 信号通路,在 10<sup>8</sup>-10<sup>6</sup> mol/L 范围内对细胞增 殖、ALP活性有剂量依赖性的增强作用,而在105 mol/L范围内 有抑制作用;在最佳浓度时,可以增加成骨基因的 mRNA 水 平、IGF1R和AKT的磷酸化。本研究结果显示ASA(105、106、 107 和 108 mol/L) 以剂量依赖性方式促进卵巢切除组 rBMSC 的增殖,以10<sup>5</sup> mol/L 最显著,而 ASA (10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup> mol/L)则抑制 rBMSC 增殖,以 104 mol/L 最显著;且在不同浓 度 ASA 中 ALP 的活性均增加,其中 ASA(10<sup>-5</sup> mol/L)组 ALP 活性增加最显著,表明 ASA(105 mol/L)是刺激骨质疏松模型 rBMSC 成骨分化的最佳浓度。

Li C 等<sup>[24]</sup>证实 ASA 可能通过激活 PI3K/AKT 和 CREB 通 路对缺氧诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用。Zhao Y 等<sup>[2]</sup>研究 表明青盐方 70%乙醇提取物对绝经后骨质疏松症有一定的抗 骨丢失作用,具有潜在的治疗作用,其分子机制与成骨细胞中 雌激素受体 (ER) 依赖性丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK) /ERK 和 PI3K/Akt 信号通路的激活、破骨细胞中 ER 依赖性 p-ERK 和 ER 非依赖性 p-Akt 蛋白表达的下调有关。上述研究 表明 PI3K/AKT 信号通路在细胞的增殖、迁移和分化等具有重 要调控作用,而 ASA 可能通过此信号通路发挥其调控 rBMSCs 成骨分化的作用。本研究证实 PI3K 通路抑制剂 wortmannin 干 扰 ASA 诱导的卵巢切除组 rBMSCs 成骨分化;ASA 治疗显著 提高了卵巢切除组 rBMSCs 成骨基因的表达, 而 PI3K 通路抑 制剂 wortmannin 则干扰 ASA 诱导的卵巢切除组 rBMSCs 成 骨基因表达;ASA 治疗显著上调了 PI3K、p-AKT 的表达,而 wortmannin 下调了 PI3K、p-AKT 的表达,表明 ASA 通过激活 PI3K/AKT 通路刺激骨质疏松模型 rBMSCs 成骨分化。 PI3K/AKT 作为重要的信号通路,调控细胞的生存、增殖、分化 等多个病理生理过程<sup>[26,27]</sup>。PI3K 通路在细胞增殖、分化、粘附和 凋亡中起主要作用,最近的研究表明 PI3K/AKT 信号通路与骨 组织代谢密切相关,通过抑制 P2X7/PI3K/AKT 信号通路,增加 骨保护素(OPG)/RANKL 比值,导致骨质疏松<sup>[28]</sup>。在成骨细胞 中,PI3K/AKT 通路的激活已被证明可以刺激增殖和分化,同时 抑制凋亡<sup>[29]</sup>。此外,PI3K/AKT 通路可影响破骨细胞形成<sup>[30]</sup>。相 反,AKT的激活通过阻断小鼠成骨细胞磷脂酰肌醇-3,4,5-三 磷酸 3-磷酸酶的表达来增加骨量<sup>[31]</sup>。最近关于 PI3K 信号通路 的研究均强调了 PI3K/AKT 信号通路在骨质疏松中的参与<sup>[22]</sup>。 因此,无论在正常还是病理条件下,PI3K/AKT 通路都是维持骨 稳定性的关键。

综上所述,ASA 能促进骨质疏松模型 rBMSCs 增殖, 增强 ALP 活性, 增强 ALP、OPN 和 RUNX2 的表达, 而 PI3K 通路抑 制剂 wortmannin 降低了这些成骨作用,并降低了 ASA 诱导的 PI3K、p-AKT 水平,表明 ASA 通过 PI3K/AKT 信号通路促进骨 质疏松模型 rBMSCs 成骨分化。

#### 参考文献(References)

- He J, Xu S, Zhang B, et al. Gut microbiota and metabolite alterations associated with reduced bone mineral density or bone metabolic indexes in postmenopausal osteoporosis[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(9): 8583-8604
- [2] Roh YH, Lee ES, Ahn J, et al. Factors affecting willingness to get assessed and treated for osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2019, 30(7): 1395-1401
- [3]《中国老年骨质疏松症诊疗指南》(2018)工作组,中国老年学和老年 医学学会骨质疏松分会,马远征,等.中国老年骨质疏松症诊疗指南 (2018)[J].中国骨质疏松杂志, 2018, 24(12): 1541-1567
- [4] 吴铭,张岩.调控骨髓间充质干细胞成骨分化的 Wnt/β-catenin 信号 通路及相关因素[J].中国组织工程研究, 2021, 25(1): 116-122
- [5] Li H, Wu W, He X, et al. Applying vibration in early postmenopausal osteoporosis promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and suppresses postmenopausal osteoporosis progression[J]. Biosci Rep, 2019, 39(9): BSR20191011
- [6] Zhao B, Xing G, Wang A. The BMP signaling pathway enhances the osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with osteoporosis[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 462
- [7] 马丹.川续断皂苷VI对人牙周膜干细胞增殖和成骨向分化的影响及 其机制研究[D].山东大学, 2020
- [8] Niu Y, Li Y, Huang H, et al. Asperosaponin VI, a saponin component from Dipsacus asper wall, induces osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway[J]. Phytother Res, 2011, 25(11): 1700-1706
- [9] Xi JC, Zang HY, Guo LX, et al. The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 640-645
- [10] 陈巧玲,白亦光,别俊,等.靶向抑制 Akt 对成骨细胞分化 PI3K/Akt 信号通路调控的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(12): 2123-2128
- [11] 张卫华,陈东.体外冲击波联合富血小板血浆对骨质疏松骨折大鼠 骨愈合的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(3): 422-427
- [12] Patel A, Silverman S, Baghdadi J, et al. Osteoporotic Fracture Risk and Health Care Burden in Patients With Cirrhosis [J]. J Clin Gastroenterol, 2019, 53(7): 543-548
- [13] Lu J, Ren Z, Liu X, et al. Osteoporotic Fracture Guidelines and Medical Education Related to the Clinical Practices: A Nationwide Survey in China[J]. Orthop Surg, 2019, 11(4): 569-577
- [14] Wang X, Li C, He Y, et al. Anti-osteoporosis medication treatment pattern after osteoporotic fracture during 2010-2016 in Fujian, China [J]. Arch Osteoporos, 2020, 15(1): 134
- [15] 贾文斌,刘超,邹燕. 抗骨质疏松治疗药物研究的新进展[J]. 药学实 践杂志, 2017, 35(6): 490-494, 542
- [16] 王志鹏,宋敏,赵文韬,等. 骨质疏松症药物治疗的有限元分析研究 进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(7): 971-974, 980
- [17] 赵金龙,梁桂洪,韩燕鸿,等. 川续断提取物续断皂苷Ⅵ防治骨质疏 松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(5): 755-759
- [18] 汪文来,鞠大宏,刘梅洁,等. 续断有效成分药理学研究进展[J]. 中国

医药导刊, 2015, (10): 1059-1060

- [19] Liu ZG, Zhang R, Li C, et al. The osteoprotective effect of Radix Dipsaci extract in ovariectomized rats [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123 (1): 74-81
- [20] Niu YB, Kong XH, Li YH, et al. Radix Dipsaci total saponins stimulate MC3T3-E1 cell differentiation via the bone morphogenetic protein-2/MAPK/Smad-dependent Runx2 pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4468-4472
- [21] Ma D, Wang X, Ren X, et al. Asperosaponin VI Injection Enhances Orthodontic Tooth Movement in Rats [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e922372
- [22] Liu K, Liu Y, Xu Y, et al. Asperosaponin VI protects against bone destructions in collagen induced arthritis by inhibiting osteoclastogenesis[J]. Phytomedicine, 2019, 63: 153006
- [23] Fang Y, Xue Z, Zhao L, et al. Calycosin stimulates the osteogenic differentiation of rat calvarial osteoblasts by activating the IGF1R/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Cell Biol Int, 2019, 43 (3): 323-332
- [24] Li C, Tian J, Li G, et al. Asperosaponin VI protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt and CREB pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1-3): 100-107
- [25] Zhao Y, Xu Y, Zheng H, et al. QingYan formula extracts protect against postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rat model via active ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113644
- [26] Kong Y, Nie ZK, Li F, et al. MiR-320a was highly expressed in postmenopausal osteoporosis and acts as a negative regulator in MC3T3E1 cells by reducing MAP9 and inhibiting PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Mol Pathol, 2019, 110: 104282
- [27] 何艳,布海切木·卡德尔,周晓珊,等. 藏红花素通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制成骨细胞凋亡引起的骨质疏松 [J]. 医学研究杂志, 2021, 50(1): 85-90, 96
- [28] Ma Y, Ran D, Zhao H, et al. Cadmium exposure triggers osteoporosis in duck via P2X7/PI3K/AKT-mediated osteoblast and osteoclast differentiation[J]. Sci Total Environ, 2021, 750: 141638
- [29] Yin R, Jiang J, Deng H, et al. miR-140-3p aggregates osteoporosis by targeting PTEN and activating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Hum Cell, 2020, 33(3): 569-581
- [30] Wang Y, Han X, Zang T, et al. miR-29b enhances the proliferation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with castration-induced osteoporosis through the PI3K/AKT and TGF-β/Smad signaling pathways [J]. Exp Ther Med, 2020, 20 (4): 3185-3195
- [31] Xi J, Li Q, Luo X, et al. Celastrol inhibits glucocorticoid?induced osteoporosis in rat via the PI3K/AKT and Wnt signaling pathways[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(5): 4753-4759
- [32] 林德民,谢兴文,李宁,等. PI3K/AKT 通路与骨质疏松症的关系及 中医药干预的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(6): 922-926