

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.004

补骨脂素对大鼠骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化的影响*

张洪跃¹ 周潘宇¹ 汪 洋¹ 许硕贵^{1Δ} 王秀会²

(1 第二军医大学附属长海医院急诊科 上海 200433; 2 上海浦东新区周浦医院 上海 201318)

摘要 目的:探讨补骨脂素对大鼠骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化的影响及其可能机制。**方法:**选取3月龄无特定病原体级健康雌性SD大鼠25只,通过切除卵巢建立绝经大鼠模型。6周后,通过全骨髓贴壁法分离BMSCs并进行原代和传代培养,传至3代后进行成骨和成脂诱导,并按补骨脂素浓度梯度0、5、10、15、20 μmol/L进行处理。细胞增殖2周后,通过碱性磷酸酶(ALP)染色实验和油红O染色观察BMSCs成骨和成脂的分化,应用蛋白免疫印迹法测定核心结合蛋白因子RUNX2、骨钙素(OCN)、增强子结合蛋白β(C/EBP-β)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPAR-γ)的表达。**结果:**成骨诱导BMSCs在补骨脂素的作用下ALP染色呈阳性反应,且补骨脂素的浓度为15 μmol/L时阳性反应最强。RUNX2、OCN蛋白的表达随着补骨脂素浓度的升高而升高,差异具有统计学意义(P<0.05)。与空白组比较,成脂诱导BMSCs在补骨脂素的作用下油红O染色阳性反应程度出现下降,补骨脂素浓度为20 μmol/L时,油红O染色阳性率最低。C/EBP-β、PPAR-γ蛋白的表达均随着补骨脂素浓度的升高而降低,差异具有统计学意义(P<0.05)。**结论:**补骨脂素体外可增强BMSCs成骨分化及抑制BMSCs成脂分化,可能与其调节RUNX2、OCN、C/EBP-β和PPAR-γ蛋白的表达有关。

关键词:补骨脂素;成骨诱导;成脂诱导;骨髓间充质干细胞

中图分类号:R-33;R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)15-2813-04

Effects of Psoralen on the Osteogenesis and Adipocyte Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) from Rats*

ZHANG Hong-yue¹, ZHOU Pan-yu¹, WANG Yang¹, XU Shuo-gui^{1Δ}, WANG Xiu-hui²

(1 Department of emergency, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 Pudong new area Zhoupu hospital, Shanghai, 201318, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Psoralen on the Osteogenesis and adipocyte differentiation of Bone Mesenchymal Stem cells (BMSCs) from Rats. **Methods:** Twenty-five 3-month-old specific pathogen free female Sprague-Dawley rats were selected and. The model of rat menopause was established by ovariectomy. Six weeks later, the BMSCs from SD rats were isolated and purified by using attachment method, then BMSCs were used for primary and secondary culture, osteogenic and adipogenic induction were carried out after the third generation. The BM-MSCs were processed by psoralen to make the psoralen concentration of 0, 5, 10, 15, 20 μmol/L. After 2 weeks of cell proliferation, alkaline phosphatase(ALP)staining and the oil Red O staining were used to determine the situation of Osteogenesis and adipocyte differentiation. After 2 weeks' induction, the expression of the core binding protein 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN), a peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-γ), enhancer binding protein beta(C/EBP-β) were detected by western blot. **Results:** After osteogenic induction: the positive expression of ALP of BMSCs in the 5, 10, 15, 20 μmol/L groups were all increased compared to the blank group, with highest in the 15 μmol/L group. The expression of RUNX2 and OCN protein increased with the increase of psoralen concentration, the difference was statistically significant (P<0.05). After adipocyte induction: the positive expression of Oil Red O staining of BMSCs in the 5,10,15,20 μmol/L groups were all decreased compared to the blank group, with lowest in the 20 μmol/L group. The expression of C/EBP-β and PPAR-γ protein were reduced with the increasing of psoralen concentration, the difference was statistically significant (P<0.05). **Conclusion:** Psoralen could enhance the osteogenic differentiation and inhibit the adipogenesis of BMSCs, which might be related to mediating the expressions of RUNX2, OCN, C/EBP-β and PPAR-γ.

Key words: Psoralen; Osteogenic induction; Adipogenic induction; Bone mesenchymal stem cells

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)15-2813-04

前言

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种由于成骨细胞的骨形成功能和破骨细胞的骨吸收功能之间的不平衡导致骨量下降、骨

* 基金项目:上海市卫生局科研计划项目(20134394)

作者简介:张洪跃(1984-),男,硕士研究生,住院医师,研究方向:再生骨科医学

Δ 通讯作者:许硕贵(1969-),男,博士,主任医师,研究方向:记忆合金材料

(收稿日期:2017-02-10 接受日期:2017-02-28)

组织微结构损坏、骨质脆性增加易造成骨折的疾病,特别是绝经后妇女,因雌激素缺失容易发生绝经后骨质疏松^[1,2]。目前,临床上治疗骨质疏松的化学药物雌激素和双磷酸盐长期使用副作用较大,可能引起骨坏死、乳腺癌等^[3]。研究显示^[4]中药治疗骨质疏松具有特殊的优势,补骨脂素和异补骨脂素均有抗骨质疏松的作用,且副作用小,但其具体机制尚不明确^[5]。有研究显示大鼠骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 可分化成为成骨细胞、成脂细胞等,起促进骨组织的发育、损伤后修复和再生的作用^[6-8]。在体外诱导实验中,激素可以调节鼠 BMSCs 的成骨成脂分化^[9]。因此,本研究对大鼠的 BMSCs 进行成骨和成脂的诱导,然后应用不同浓度的补骨脂素对细胞进行处理,探讨不同浓度补骨脂素对大鼠 BMSCs 成骨及成脂诱导的影响及其可能作用机制,以期对抗骨质疏松药物的进一步开发及骨质疏松的预防和治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄 SPF 级健康雌性 SD 大鼠 16 只,体重 230~280 g。均由长海医院动物中心提供,合格证号:SCXK2009-0006-157。

1.2 实验试剂和药物

DMEM 培养基(美国 Sigma 公司);青-链霉素溶液(penicillin-streptomycin, P/S)、10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、补骨脂素(美国 Gibco 公司,纯度>99%)油红 O 染液、茜素红染液(南京建成生物工程研究所);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、维生素 C、 β -甘油磷酸钠、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、丙烯酰胺、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)、过硫酸钠、低糖 DMEM(美国 Abeam 公司);胰蛋白酶(1:250)、 β -甘油磷酸钠、胰岛素、地塞米松、吡哆美辛(德国 Sigma 公司);四甲基罗丹明异硫氰酸盐(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)、标记荧光二抗异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(美国 Gibco 公司); β -actin 一抗(美国 Sigma 公司);C/EBP- β 一抗、PPAR- γ 一抗、骨钙素(osteocalcin, OCN) 一抗、核心结合蛋白因子 2(runt-related transcription factor 2, RUNX2)一抗(美国 Santa Cruz 公司)。

1.3 实验仪器

仪器:生物洁净安全柜(苏州净化集团有限公司);CO₂ 培养箱((THERMO FORMA 3110, 美国);超纯水仪(SG 水处理及再生技术公司);DS 型电热恒温水箱、CX-250W 超声波清洗器(北京医疗设备厂);电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);培养板、培养瓶、培养皿(Corning, 美国);荧光显微镜(Olympus, 日本);普通光学显微镜、倒置相差显微镜(LEICA, 德国);酶标仪(Thermo Labsystems 公司, 美国);电泳仪(BIO-RAD 公司, 美国);胶片自动冲洗机(广州医疗器械设备厂);扫描仪(EPSON 公司, 日本);低温离心机(UNIVERSAL 32R HETTICH, 德国)。

1.4 绝经大鼠模型的制备

将 16 只 3 月龄大鼠进行腹腔注射麻醉,麻醉剂选用 1%体积分数的戊巴比妥钠,注射剂量为 40 mg/kg,背侧入路。麻醉后

在大鼠脊柱旁 1 cm,后方髂骨嵴上 2 cm 处纵行切开,切口长约为 1 cm,暴露出大鼠卵巢后切除并用丝线结扎,最后手术缝合伤口,继续饲养 6 周。

1.5 BMSCs 的分离和培养

6 周后颈椎脱臼法处死大鼠,使用 75%的酒精消毒后置于生物洁净安全柜,分离出股骨、胫骨, PBS 冲洗两遍,眼科剪剪开股骨、胫骨两端,1 mL 注射器吸取 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔,直至骨髓腔颜色发白。经 200 目筛网过滤后,将细胞悬液转移到培养瓶中,加入含有双抗(100 U/mL 的青霉素)和 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 5% CO₂ 培养箱内培养。24 h 首次进行换液,吸弃培养液, PBS 轻柔两遍,之后每 2 d 进行一次换液,直至细胞在培养瓶上长至 80~90%比例时,进行传代培养,传代比例 1:2。传至第三代时再进行后续的实验。

1.6 BMSCs 的成骨成脂诱导及补骨脂素处理

将纯化培养并传至三代的 BMSCs 进行消化,消化液为 0.02%EDTA 和 0.25%胰蛋白酶混合液,转移细胞至装有细胞爬片的 6 孔板,进行接种。观察细胞生长状态,并对细胞爬片上 BMSCs 细胞计数。每孔细胞爬片 2×10^4 细胞或者待细胞生长值 90%面积时开始进行诱导。诱导方法即添加成脂诱导培养液到 BMSCs 培养板。成脂诱导液配方为:5 mg/L 的牛胰岛素、1 μ mol/L 的地塞米松、500 μ mol/L 的异丁基甲基黄嘌呤(IBM-X)、100 μ mol/L 的吡哆美辛;成骨诱导液配方为:含 10%胎牛血清和青/链霉素双抗的 DMEM 培养基、10 mmol/L 甘油磷酸钠、50 mg/L 的维生素 C 磷酸酯、100 nmol/L 的地塞米松。对成骨及成脂诱导的细胞添加浓度为 5、10、20、40 μ mol/L 的异补骨脂素溶液,对照组加入相同体积不含异补骨脂素的载体溶液(DMSO),常规每 3 天更换一次培养液。

1.7 碱性磷酸酶(ALP)染色及油红 O 染色

ALP 染色:成骨诱导 14 天后取出细胞爬片, PBS 冲洗,依次进行冷丙酮固定、 β -甘油磷酸钠孵育、2%硝酸钴浸泡、1%硫化按浸泡,蒸馏水洗净干燥,树脂封固后在 100 $\times$ 显微镜下进行观察。油红 O 染色:成脂诱导 9 天后取出长细胞爬片,用 PBS 清洗,依次进行 10%福尔马林固定、饱和油红 O 染液孵育,60%异丙醇洗去多余染液后,加入苏木素染液,蒸馏水洗净干燥后在 100 $\times$ 显微镜下进行观察,在高倍镜下随机挑选 5 个视野,计数 ALP 阳性细胞数和细胞总数,计算 ALP 的阳性率。

1.8 免疫印迹实验(Western blotting)

提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳。每个加样槽 SDS 上样缓冲液中加入 20 μ g 蛋白。电泳结束后转移 SDS-PAGE 上的蛋白印迹到 PVDF 膜上,加入一抗后,在摇床上进行孵育,成骨诱导一抗检测的蛋白为 OCN(1:1000)、RUNX2(1:1000);成脂诱导一抗检测蛋白为 C/EBP- β (1:1000)、PPAR-1(1:1000)和 β -肌动蛋白(β -actin, 1:2500)。PVDF 膜在一抗室温孵育 1 h 后使用 TBST 清洗 5 min,一共 3 次。然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,再用 TBST 在清洗摇床上清洗 3 次。最后在暗室中使用荧光发光试剂显色和胶片曝光,曝光完毕后使用机器冲洗出蛋白免疫印迹的底片。扫描仪进行扫描,并记录实验结果,应用 Image-J 测量各条带的相对灰度值 (Gray Value),计算平均相对灰度值 ARG。

1.9 统计学分析

采用 SPSS17.0 对收集的数据进行统计分析。ALP 阳性率和油红 O 阳性率为计数资料, 补骨脂素浓度 (0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 之间 ALP 阳性率和油红 O 阳性率的比较采用卡方检验。OCN、RUNX2、C/EBP- β 、PPAR- γ 蛋白表达量通过 ARG 进行表示, ARG 值为计量资料, Shapiro-Wilk 检验资料是否为正态分布且方差齐, 若呈正态分布方差齐, 多组之间比较采用单因素方差分析, 补骨脂素 (5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$) 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 两两比较采用 LSD-t 检验。若资料不呈正态分布, 多组之间比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 两两比较采用 Mann-Whitney 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度补骨脂素对成骨诱导的 BMSCs ALP 阳性率及成脂诱导的 BMSCs 油红 O 染色阳性率的影响

成骨诱导组不同浓度补骨脂素 ALP 染色阳性率均高于对照组, 且补骨脂素浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 时, ALP 染色阳性率最高, 各组与对照组相比差异均具有统计学意义 (P<0.05)。成脂诱导组不同浓度补骨脂素油红 O 染色阳性率均低于对照组, 且补骨脂素浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 油红 O 染色阳性率最低, 各组与对照组相比差异均具有统计学意义 (P<0.05)。见表 1。

表 1 不同浓度补骨脂素对成骨诱导的 BMSCs ALP 阳性率及成脂诱导的 BMSCs 油红 O 染色阳性率的影响

Table 1 Effect of different concentrations of psoralen on the ALP positive rate in the BMSCs induced by osteogenic induction and oil red O staining positive rate in the BMSCs induced by adipogenic induction

Groups	OI (ALP positive rate)	AI (Oil O positive rate)
Control	0.15	0.18
5 $\mu\text{mol/L}$	0.27	0.13
10 $\mu\text{mol/L}$	0.43	0.08
15 $\mu\text{mol/L}$	0.48	0.05
20 $\mu\text{mol/L}$	0.35	0.02
P	0.000	0.001

注: OI= 成骨诱导组; AI= 成脂诱导组。

Note: OI= osteogenic inducing group; AI= adipogenic inducing group.

2.2 不同浓度补骨脂素对成骨诱导的 BMSCs OCN 和 RUNX2 蛋白表达的影响

OCN 和 RUNX2 蛋白表达量相对灰度值呈正态分布且方差齐, 单因素方差分析结果显示各组 OCN 和 RUNX2 蛋白表达量比较差异具有统计学意义 (P<0.05)。LSD-t 两两比较结果显示: BMSCs 成骨诱导时, 补骨脂素浓度为 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 时, RUNX2 蛋白表达量显著高于对照组; 补骨脂素各浓度组 OCN 蛋白表达量均高于对照组, 以上差异均具有统计学意义 (P<0.05)。15 $\mu\text{mol/L}$ 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素组蛋白 RUNX2 和 OCN 表达量差异无统计学意义 (P>0.05), 见表 2。

2.3 不同浓度补骨脂素对成脂诱导的 BMSCs C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白表达的影响

C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白表达量相对灰度值呈正态分布

且方差齐, 单因素方差分析结果显示各组 C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白表达量比较, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。LSD-t 两两比较结果显示: BMSCs 成脂诱导时, 补骨脂素浓度为 5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 时, C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白表达量均显著低于对照组; 各组间两两比较差异均具有统计学意义 (P<0.05), 见表 3。

表 2 不同浓度补骨脂素对成骨诱导的 BMSCs RUNX2 和 OCN 蛋白表达的影响

Table 2 Effect of different concentrations of psoralen on the RUNX2 and OCN protein expressions in the BMSCs induced by osteogenic induction

Groups	RUNX2 (n=5)	OCN (n=5)
Control	1.14 $\pm$ 0.18 $^{\omega}$	1.09 $\pm$ 0.16
5 $\mu\text{mol/L}$	1.26 $\pm$ 0.34 $^{\omega}$	1.87 $\pm$ 0.05
10 $\mu\text{mol/L}$	3.07 $\pm$ 0.13	2.31 $\pm$ 0.27
15 $\mu\text{mol/L}$	3.93 $\pm$ 0.11 $^{\tau}$	2.96 $\pm$ 0.19 $^{\nu}$
20 $\mu\text{mol/L}$	4.04 $\pm$ 0.19 $^{\tau}$	3.26 $\pm$ 0.41 $^{\nu}$
P	0.000	0.000

注: RUNX2 2 型核心结合蛋白因子; OCN 骨钙素; ω , ν , τ 相同字母表示 P>0.05。

Note: RUNX2=run relate gene 2; OCN= osteocalcin. ω , ν , τ same alphabet means P>0.05.

表 3 不同浓度补骨脂素对成脂诱导的 BMSCs C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白表达的影响

Table 3 Effect of different concentrations of psoralen on the C/EBP- β and PPAR- γ protein expressions in the BMSCs induced by adipogenic induction

Groups	PPAR- γ	C/EBP- β
Control	1.23 $\pm$ 0.12	1.08 $\pm$ 0.12
5 $\mu\text{mol/L}$	0.75 $\pm$ 0.16	0.63 $\pm$ 0.14
10 $\mu\text{mol/L}$	0.64 $\pm$ 0.13	0.53 $\pm$ 0.05
15 $\mu\text{mol/L}$	0.43 $\pm$ 0.13	0.32 $\pm$ 0.12
20 $\mu\text{mol/L}$	0.23 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.13
P	0.000	0.000

注: C/EBP- β 为 CCAAT 增强子结合蛋白 β ; PPAR- γ 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 。

Note: C/EBP- β =CCAAT/enhancer binding protein beta; PPAR- γ = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

3 讨论

骨代谢动态平衡是维持机体骨骼系统健康的重要因素^[10]。绝经后女性体内雌激素水平下降与骨密度降低有关^[11]。成骨细胞和成脂细胞均由同一种前体细胞 BMSCs 分化而来, 绝经后的女性随着年龄的增加, 雌激素水平下降, 成脂分化能力得到增强, 成骨分化活动受到抑制^[12]。因此, 对于绝经后骨质疏松患者的理想的治疗策略是促进 BMSCs 成骨分化并抑制其向脂肪细胞的转化, 从而增加体内骨形成量。补骨脂作为我国传统中药对骨质疏松、骨关节病上具有良好的治疗效果^[13]。其中, 补骨脂素是补骨脂的主要成分, 来源于香豆素类化合物, 具有植物雌激素的作用^[14]。目前, 补骨脂素对 BMSCs 成骨和成脂分化

的影响和机制还未明确。

为了确定补骨脂素对骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化的影响,本研究选取 SD 大鼠为研究对象,切除卵巢模拟绝经模型,在体外对大鼠 BMSCs 进行成骨和成脂诱导,并使用不同浓度的补骨脂素进行处理。通过 ALP 染色、油红 O 染色探讨不同浓度补骨脂素对成骨诱导的 BMSCs ALP 阳性率及成脂诱导的 BMSCs 油红 O 染色阳性率的影响。结果显示:5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的补骨脂素均有增强大鼠 BMSCs 成骨分化和抑制大鼠 BMSCs 成脂分化的作用,与其他学者研究结果一致^[15-17],说明补骨脂素对于绝经模型大鼠骨的形成具有一定的促进作用,提示补骨脂素可能参与某种成骨机制并发挥调节作用。

对于 BMSCs 成骨和成脂分化,其经典通路是 Wnt/p-catenin 通路^[18,19]。研究表明 Wnt 经典通路可以促进 BMSCs 的分化,RUNX2 和 OCN 是 Wnt 通路上的重要调控因子,其表达量的增加能够促进成骨细胞的形成^[20-22]。Wnt 经典通路还能够抑制 BMSCs 成脂分化的关键转录因子 C/EBP- β 和 PPAR- γ 的表达来抑制细胞的成脂分化活动^[23,24],PPAR- γ 表达量增加能够使成骨分化减少,增强破骨细胞分化并促进骨的重吸收^[25-27]。为了进一步探讨补骨脂素影响 BMSCs 成骨和成脂分化的机制,明确补骨脂素在 Wnt 经典通路中对于 RUNX2、OCN、C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白的表达是否有调节作用,本研究通过对 BMSCs 进行体外成骨和成脂诱导,同时处理不同浓度的补骨脂素,结果显示补骨脂素能促进成骨分化关键调控因子 RUNX2 和 OCN 蛋白的表达,抑制成脂分化关键转录因子的 C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白的表达,提示补骨脂素促进 BMSCs 成骨分化,抑制成脂分化可能与调节 RUNX2、OCN、C/EBP- β 和 PPAR- γ 蛋白的表达有关。

本研究通过建立大鼠绝经模型,体外诱导大鼠 BMSCs,初步探讨了补骨脂素对绝经后大鼠骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化的影响,未涉及到补骨脂素对于老年骨质疏松的影响和机制,对于补骨脂素是否还能促进老年鼠 BMSCs 的成骨分化,以及是否调节同样的关键蛋白等今后还需要加强机制研究,为下一步的临床研究工作奠定基础,从而为绝经后骨质疏松的治疗提供依据。

参考文献(References)

- [1] Yuan X, Bi Y, Yan Z, et al. Psoralen and Isopsoralen Ameliorate Sex Hormone Deficiency-Induced Osteoporosis in Female and Male Mice [J]. Biomed Research International, 2016, 2016(4): 1-8
- [2] Mediero A, Cronstein B N. Adenosine and bone metabolism [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2013, 24(6): 290-300
- [3] Recker R R, Lewiecki E M, Miller P D, et al. Safety of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis [J]. American Journal of Medicine, 2009, 122(2 Suppl): S22
- [4] Wang Z Q, Li J L, Sun Y L, et al. Chinese herbal medicine for osteoporosis: a systematic review of randomized controlled trails[M]. Centre for Reviews and Dissemination (UK), 2013
- [5] Li W D, Yan C P, Wu Y, et al. Osteoblasts proliferation and differentiation stimulating activities of the main components of Fructus Psoraleae corylifoliae [J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2014, 21(4): 400-405
- [6] Gronthos S, Zannettino A C, Hay S J, et al. Molecular and cellular

- characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow [J]. Journal of Cell Science, 2003, 116 (9): 1827-1835
- [7] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells [J]. Science, 1999, 284 (5411): 143-147
- [8] Zhang Z L, Tong J, Lu R N, et al. Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration [J]. Bone Marrow Transplantation, 2009, 43(1): 69-81
- [9] Liao C, Li T, Liu Y, et al. Salvianolic Acid B Prevents Bone Loss in Prednisone-Treated Rats through Stimulation of Osteogenesis and Bone Marrow Angiogenesis[J]. Plos One, 2012, 7(4): e34647
- [10] Collazos G, Yohanna C, Dueñas, et al. Guía para el diagnóstico, atención integral y seguimiento de asma en niños y niñas[D]. Universidad Colegio Mayor Nuestra Señora Del Rosario, 2013
- [11] Cauley J A. Estrogen and bone health in men and women[J]. Steroids, 2015, 99(Pt A): 11-15
- [12] Kha H T, Basseri B, Shouhed D, et al. Oxysterols Regulate Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Pro-Bone and Anti-Fat [J]. Journal of Bone & Mineral Research the Official Journal of the American Society for Bone & Mineral Research, 2004, 19(5): 830-840
- [13] Gao Z M, Pharmacy D O, Hospital Z P. Effects and Mechanism of Psoralen Acetone Extract on Osteoporosis [M]. Guide of China Medicine, 2013
- [14] Xin D, Wang H, Yang J, et al. Phytoestrogens from Psoralea corylifolia reveal estrogen receptor-subtype selectivity [J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2009, 17 (2): 126-131
- [15] Tang D Z, Yang F, Yang Z, et al. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2011, 405(2): 256-261
- [16] Wong R W, Rabie A B. Effect of psoralen on bone formation[J]. Journal of Orthopaedic Research Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 2011, 29(2): 158-164
- [17] Tsai M H, Huang G S, Hung Y C, et al. Psoralea corylifolia extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats [J]. American Journal of Chinese Medicine, 2007, 35(4): 669-680
- [18] Westendorf J J, Kahler R A, Schroeder T M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases[J].Gene, 2004, 341(1-2): 19-39
- [19] Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, et al. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2005, 329(1): 177-181
- [20] Kühn S J, Kühn M. On the role of Wnt/ β -catenin signaling in stem cells[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2013, 1830(2): 2297-2306
- [21] Wan K Z W S, Makpol S, Sathapan S, et al. Alteration of gene expression levels during osteogenic induction of human adipose derived stem cells in long-term culture [J]. Cell & Tissue Banking, 2013, 14 (2): 289-301
- [22] Zoch M L, Clemens T L, Riddle R C. New insights into the biology of osteocalcin [J]. Bone, 2016, 82: 42-49
- [23] Ross S E, Hemati N, Longo K A, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling [J]. Science, 2000, 289(5481): 950-953

与肺组织和血清中的表达结果一致,提示 let-7a 可能参与了哮喘中的 T 淋巴细胞亚群失衡。为证实该假设,我们分选了哮喘患者外周血中的 Th1、Th2 和 Th17 细胞,并检测了 let-7a 的表达水平。结果表明,let-7a 在哮喘患者的 Th2 和 Th17 细胞中表达明显下调,而在 Th1 细胞中的表达没有变化,提示 let-7a 是哮喘中 T 淋巴细胞亚群失衡的主要关键分子。进一步,我们从正常人外周血中分选了 Naive T 淋巴细胞,体外诱导刺激分化成哮喘炎性的 Th1、Th2 和 Th17 细胞,Real-time PCR 检测 let-7a 的表达,结果表明 let-7a 与哮喘患者体内表达一致,这些结果从体内证实了 Let-7a 在哮喘相关的 Th2 和 Th17 细胞中的作用,提示 let-7a 可能通过调节 T 淋巴细胞分化促进了哮喘的发生与进展。

T 淋巴细胞亚群(Th1/Th2/Th17/Treg)失衡及其产生的细胞因子 " 风暴 " 是哮喘发生的主要原因。IL-13 是由 Th2 产生的经典的促气道黏液细胞因子,是调控气道黏液分泌的关键和强效介质^[15]。Th17 细胞分泌的 IL-17 是与哮喘发病相关的细胞因子网络的主要成员之一,在哮喘发病中起着重要作用^[16,17]。IL-17 可诱导气道嗜酸性粒细胞浸润,参与气道高反应性的发生;同时促进气道中性粒细胞的募集、激活,参与哮喘气道慢性炎症反应。本研究中,我们进一步揭示了哮喘中 let-7a 对 Th2 和 Th17 细胞功能的影响,发现 let-7a mimic 降低了 Th2 细胞中 IL-13 的分泌表达和 Th17 细胞中 IL-17 的分泌表达,改变了 Th2 和 Th17 细胞的功能。这些结果提示哮喘中低表达的 let-7a 与 Th2 和 Th17 相关的细胞因子 IL-13 和 IL-17 的高表达密切相关,促进哮喘的发生,是哮喘发病的关键分子,有望成为哮喘治疗的潜在靶点。已有文献报道^[9],let-7a 能够与 IL-13 的 mRNA 结合从而抑制 Th2 细胞中 IL-13 的表达,但是 let-7a 如何调控 IL-17 的机制仍不清楚,有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment[J]. *BMJ*, 2014, 349: g5517
- [2] Lai CK, Ko FW, Bhome A, et al. Relationship between asthma control status, the Asthma Control Test™ and urgent health-care utilization in Asia[J]. *Respirology*, 2011, 16(4): 688-697
- [3] Lu TX, Rothenberg ME. Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(1): 3-13
- [4] Rijavec M, Korošec P, Žavbi M, et al. Let-7a is differentially expressed in bronchial biopsies of patients with severe asthma[J]. *Sci Rep*, 2014 (4): 6103-6108
- [5] Kumar M, Ahmad T, Sharma A, et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 128(5): 1077-1085
- [6] Frixa T, Donzelli S, Blandino G. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7 (4): 2466-2485
- [7] Cogoni C, Ruberti F, Barbato C. MicroRNA landscape in Alzheimer's disease[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2015, 14(2): 168-175
- [8] Azizian A, Gruber J, Ghadimi BM, et al. MicroRNA in rectal cancer [J]. *World J Gastrointest Oncol*. 2016, 8(5): 416-426
- [9] Yang L, Boldin MP, Yu Y, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(9): 1655-1670
- [10] Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(5): 1423-1432
- [11] Munitz A, Karo-Atar D, Foster PS. Asthma diagnosis: MicroRNAs to the rescue[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(5): 1447-1448
- [12] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 57-65
- [13] Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D2 and T (H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma [J]. *Korean J Intern Med*, 2011, 26(1): 8-18
- [14] Strickland DH, Holt PG. T regulatory cells in childhood asthma[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(9): 420-427
- [15] Kuperman DA, Huang X, Koth LL, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma[J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 885-889
- [16] Shalaby KH, Martin JG. Overview of asthma; the place of the T cell [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(3): 218-225
- [17] Chen H, Xu X, Teng J, et al. CXCR4 inhibitor attenuates ovalbumin-induced airway inflammation and hyperresponsiveness by inhibiting Th17 and Tc17 cell immune response[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(5): 1865-1870
- [18] activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss [J]. *Cell Metabolism*, 2010, 11(6): 503-516
- [19] Ullah M, Stich S, Notter M, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes [J]. *Differentiation*, 2013, 85(3): 78-90
- [20] Song L, Liu M, Ono N, et al. Loss of wnt/β-catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes [J]. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2012, 27(11): 2344-2358
- [21] Kawai M, Rosen C J. PPARγ: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2010, 6(11): 629
- [22] Wei W, Wang X, Yang M, et al. PGC1β mediates PPARγ gamma

(上接第 2816 页)