

芍药苷干预成骨细胞凋亡抗骨质疏松作用研究

林紫微, 杨菲, 黄天一, 陈婷婷, 崔杰, 李梦雨, 华永庆

(江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 研究芍药苷(PF)对前成骨细胞凋亡的影响及相关机制,通过斑马鱼骨质疏松模型验证其整体效应。 **方法** 体外培养前成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞,采用地塞米松(DEX, $1 \mu\text{mol/L}$)诱导细胞凋亡,观察 PF 的干预效应。采用 MTT 法检测细胞活力,流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blot 法检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Bax 的表达,免疫荧光检测 FoxO3a 的核易位情况。建立泼尼松龙(Pred, $25 \mu\text{mol/L}$)诱导的斑马鱼骨质疏松模型,钙黄绿素染色观察 PF 对 Pred 干扰的斑马鱼骨骼面积的影响,qPCR 检测破骨标志基因抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)、组织蛋白酶 K(CTSK)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)以及成骨细胞标志基因碱性磷酸酶(ALP)、Runt 相关转录因子 2a(Runx2a)、锌指转录因子 7(Sp7)的 mRNA 变化。 **结果** PF 可缓解 DEX 对 MC3T3-E1 的细胞活力的抑制作用,并显著降低细胞凋亡率;对凋亡相关蛋白的检测发现,PF 显著促进 Bcl-2 的蛋白表达,升高 Bcl-2/Bax 的比率;进一步研究发现 PF 可显著抑制 FoxO3a 的入核。与 Pred 组相比,PF 增加了斑马鱼第一椎骨的骨骼面积,抑制了 TRAP、CTSK 和 MMP-9 的基因表达,促进了 ALP、Runx2a 和 Sp7 的基因表达。 **结论** PF 能够抑制前成骨细胞凋亡,改善斑马鱼骨质疏松,该作用可能与升高 Bcl-2/Bax 比率及抑制 FoxO3a 的核易位有关。

关键词: 芍药苷;前成骨细胞;凋亡;FoxO3a;斑马鱼;骨质疏松

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2019)04-0426-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0426

引文格式: 林紫微,杨菲,黄天一,等.芍药苷干预成骨细胞凋亡抗骨质疏松作用研究[J].南京中医药大学学报,2019,35(4):426-431.

Study on the Anti-Osteoporosis Effect of Paeoniflorin on Osteoblast Apoptosis and Zebrafish Osteoporosis Model

LIN Zi-wei, YANG Fei, HUANG Tian-yi, CHEN Ting-ting, CUI Jie, LI Meng-yu, HUA Yong-qing

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of paeoniflorin (PF) on the pre-osteoblasts cell apoptosis and its related mechanisms, and to explore the effect of PF on zebrafish osteoporosis. **METHODS** *In vitro*, the pre-osteoblast cell line MC3T3-E1 cells were cultured and the dexamethasone (DEX)-induced cell apoptosis model was used to observe the protective effect of PF. The cell viability and cell apoptosis rate were detected by MTT assay and flow cytometry respectively. Western blot was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins bcl-2 and Bax. The nuclear translocation of FoxO3a protein was detected by immunofluorescence assay. The prednisolone (Pred)-induced zebrafish osteoporosis model was established to observe the anti-osteoporosis effect of PF. The first vertebrae bone area of zebrafish was observed by calcein staining. qPCR was used to detect the mRNA expressions of osteoclast marker genes tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsin K (CTSK), matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) and osteoblast marker genes alkaline phosphatase (ALP), runt-associated transcription factor 2a (Runx2a), Sp7 transcription factor (Sp7). **RESULTS** PF alleviated the inhibitory effect of DEX on the MC3T3-E1 cell viability and reduced the cell apoptosis rate. Detection of apoptosis-related proteins revealed that PF significantly promoted Bcl-2 protein expression and increased the ratio of Bcl-2/Bax. PF also significantly inhibited the nuclear transloca-

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(81473390,30902014);江苏省中药资源产业化过程协同创新中心(012092002001-7);江苏省中药药效与安全性评价重点实验室(JKLPS201818);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

第一作者: 林紫微,女,硕士研究生,E-mail:lwz1376449630@126.com

通信作者: 华永庆,男,副研究员,主要从事中药内分泌药理研究,E-mail:hua_yq@njucm.edu.cn

tion of FoxO3a protein. Compared with the Pred group, PF increased the first vertebra bone area of zebrafish, inhibited the mRNA expressions of TRAP, CTSK and MMP-9, and promoted the mRNA expressions of ALP, Runx2a and Sp7. **CONCLUSION** PF inhibits pre-osteoblast apoptosis and alleviates zebrafish osteoporosis, which may be related to the increasing of Bcl-2/Bax ratio and inhibition of nuclear translocation of FoxO3a.

KEY WORDS: paeoniflorin; pre-osteoblast; apoptosis; FoxO3a; zebrafish; osteoporosis

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是严重威胁中老年健康的常见病和多发病之一,其特征骨量、强度和微结构的系统性损伤,从而增加了脆性骨折发生的倾向^[1-3]。OP的治疗主要分为抗骨吸收和促骨形成两类,目前临床治疗OP常用药物以抗骨吸收药物为主,如双磷酸盐等,同时使用促骨形成药物如甲状旁腺激素等。这些药物存在疗效及安全性等问题,寻找新的安全可靠的OP治疗药物已成为世界性话题。传统中药在OP的治疗和防治中具有疗效全面、安全可靠的独特优势,获得越来越多的研究者关注。

白芍是中医治疗OP最为常用的中草药之一,治疗OP常用方中超过三分之一应用了白芍^[4]。芍药苷(Paeoniflorin, PF)是白芍的主要活性成分,被广泛用于多种炎症性疾病的治疗^[5-6]。有报道称,以PF为主要成分的白芍总苷对类风湿关节炎骨丢失具有显著的治疗作用^[7]。最近的研究发现PF可通过抗骨吸收发挥抗OP作用,其可通过抑制NF- κ B信号通路抑制破骨细胞的分化和骨吸收功能^[8-9]。最新研究发现PF对成骨细胞分化可能也具有促进作用^[10]。但PF对骨形成过程的影响目前尚缺乏更多的证据,及其机制仍不清楚。本文旨在探讨PF对成骨细胞凋亡的影响,观察其对骨质疏松斑马鱼模型的干预效应,证实PF对骨形成的影响。

1 材料

1.1 实验动物与细胞

小鼠前成骨细胞细胞系MC3T3-E1细胞,购自中国科学院上海细胞库。AB品系受精后1 d(1 day post fertilization, 1 dpf)斑马鱼,购于江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 药物与试剂

芍药苷(PF, 批号: X27F8C30162)、泼尼松龙(Pred, 批号: T20J7H9291)、钙黄绿素(批号: S19167)均购自于上海源叶生物有限公司;地塞米松(DEX, 批号: WXBC3944V)、三卡因(MS-222, 批号: MKBV1603V)均购自于Sigma-Aldrich(上海);FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(批号:

8072965)购自BD Pharmingen;Bcl-2兔单克隆抗体(批号: 00062312)、Bax兔单克隆抗体(批号: 00055242)、 β -tubulin兔单克隆抗体(批号: 00056545)、FoxO3a兔单克隆抗体(批号: 00055690)均购自于proteintech;RNA isolater Total RNA Extraction Reagent(批号: 7E261KB)、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(批号: 7E242J8)、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(批号: 7E252I8)均购自于Vazyme公司。

1.3 主要仪器

Synergy2型多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);C6流式细胞仪(BD Accuri公司);ChemiDocTMXRS+数字化凝胶成像工作站(美国BIO-RAD公司);SPX-150型生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);M205FA型体式荧光显微镜(德国Leica公司);Tissuelyser-48型高通量多样品组织研磨仪(南京乔贝琳生物科技有限公司);4375786型VeritiTM 96-Well Thermal Cycler(美国Applied Biosystems公司);7500型快速实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

2 方法

2.1 PF对DEX诱导的MC3T3-E1细胞凋亡的影响

2.1.1 MC3T3-E1细胞培养 MC3T3-E1细胞置于含10%胎牛血清和1% penicillin-streptomycin的 α -MEM完全培养基,在37℃, 5% CO₂的细胞培养箱中培养,隔天换液。待细胞融合至80%~90%,用含0.2% EDTA的胰酶消化传代。

2.1.2 MTT检测细胞活力

2.1.2.1 PF对MC3T3-E1细胞活力的影响 MC3T3-E1细胞按 5×10^3 /孔接种到96孔板中,24 h后分为:空白组、对照组、0.1、1、10、25、50、100 μ mol/L PF组,共8组,每组6个复孔。空白组加入200 μ L α -MEM完全培养基;对照组加入含0.1% DMSO的 α -MEM完全培养基;给药组加入含对应终浓度的PF的培养基,每组均含0.1% DMSO。培

养 48 h 后 MTT 法检测细胞活力。

2.1.2.2 PF 对 DEX 诱导的 MC3T3-E1 细胞活力的影响 MC3T3-E1 细胞按 2.1.2.1 条件种板,24 h 后分组给药:对照组、DEX 组、0.1 $\mu\text{mol/L}$ PF 组、1 $\mu\text{mol/L}$ PF 组、10 $\mu\text{mol/L}$ PF 组和 25 $\mu\text{mol/L}$ PF 组,共 6 组,每组 6 个复孔。对照组加入含 0.1% DMSO 的 α -MEM 完全培养基,DEX 加入含 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的 α -MEM 完全培养基,PF 组同时加入含 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 和对应终浓度的 PF。细胞经培养 48 h 后检测细胞活力。

2.1.3 流式细胞术检测细胞凋亡 MC3T3-E1 细胞接种到 6 孔板中,待细胞融合至 50% 时,分组给药同 2.1.2.2。48 h 后,按 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 试剂说明书操作,流式细胞仪检测细胞凋亡率,重复 3 次实验。凋亡率=早期凋亡+晚期凋亡。

2.1.4 Western blot 检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Bax 的表达 MC3T3-E1 细胞按 2×10^5 /孔接种到 6 孔板中,24 h 后分组同 2.1.2.2。48 h 后提取细胞总蛋白,Western blot 法检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Bax 的表达,内参为 β -tubulin。

2.1.5 免疫荧光检测 FoxO3a 的表达 MC3T3-E1 细胞分为:对照组、DEX 组、1 $\mu\text{mol/L}$ PF 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ PF 组。按要求培养 48 h 后,免疫荧光法检测 FoxO3a 的蛋白表达。

2.2 PF 对 Pred 诱导的斑马鱼骨质疏松模型的影响^[11]

2.2.1 分组给药 选取健康的 3 dpf 的斑马鱼随机分为 4 组,置于 6 孔板中,每孔给予 3 mL 培养基。分组及给药方案如下:对照组、模型组、1 $\mu\text{mol/L}$ PF 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ PF 组,每组 20 条。对照加入含 0.1% DMSO 的培养基,其余各组均加入含 25 $\mu\text{mol/L}$ Pred 的培养基。5 dpf 开始给药,对照组和模型组斑马鱼培养条件不变,PF 组同时给予含 25 $\mu\text{mol/L}$ Pred 和 1 $\mu\text{mol/L}$ PF 或 10 $\mu\text{mol/L}$ PF 的培养基,所有组别均含 0.1% DMSO。连续给药 4 d 至 9 dpf。斑马鱼饲养条件为昼夜节律(昼:夜=14 h:10 h),温度为 $(28.5\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

2.2.2 钙黄绿素染色^[12] 将 9 dpf 的斑马鱼置于培养基中静置 1 h,在 0.2% 钙黄绿素($\text{pH}=7$)溶液中避光孵育 1 h,培养基漂洗数次以去除染液,再次静置 1 h。用 0.04 g/L 的三卡因对斑马鱼进行麻醉,体式荧光显微镜下成像。使用 Image J 软件中的 Plot Profile 工具对第一椎骨的骨骼面积进行测量。

2.2.3 qPCR 检测破骨细胞和成骨细胞标志基因的表达 将上述分组给药的斑马鱼麻醉处死后,qPCR 检测破骨细胞标志基因抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP, 由 Acp5 基因编码)、组织蛋白酶 K(CTSK)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)以及成骨细胞标志基因碱性磷酸酶(ALP)、Runt 相关转录因子 2a(Runx2a)、锌指转录因子 7(Sp7)的 mRNA 水平^[13]。目的基因以 GAPDH 为内参校正,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达水平。目的基因见表 1。

表 1 斑马鱼目的基因的引物序列

基因	引物上游	引物下游
Acp5	5-GGCGAAGTCCAAAGCTGATT-3'	5-CGATATGGACCACACTGGA-3'
CTSK	5-CGTCACCTTCGGTGAAGAACC-3'	5-ACAGTCCACCAGGTTCTGAG-3'
MMP-9	5-ACCTAGAACTGGCCCTGAAC-3'	5-CTGAAGGGACCACCTGAGTT-3'
ALP	5-GGCCTTACATGAAGCTGTGG-3'	5-GTTTCCTCGTGGTGTGTAGC-3'
Runx2a	5-GTGGAGATCATAGCGGACCA-3'	5-CTCCCAGAGCCACAACCTTA-3'
Sp7	5-TGGATTGACCCTCACTGGAC-3'	5-GATGGTGCTTCCCGGTTTAC-3'
GAPDH	5-TGGTGCTGGTATTGCTCTCA-3'	5-ATGGGAGAATGGTCGCGTAT-3'

2.3 统计学分析

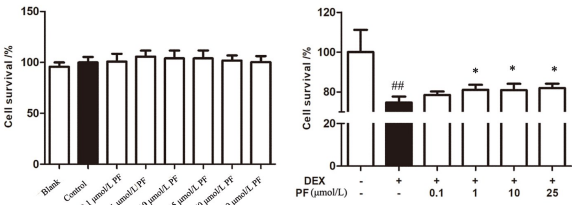
实验结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 Graphpad Prism 5 软件中 one-way ANOVA 的分析方法比较各组之间的差异,运用 Dunnett 检验方法进行组间比较,以 $P<0.05$ 代表有统计学意义。

3 结果

3.1 PF 促进 DEX 诱导降低的细胞活力

MC3T3-E1 细胞在未造模情况下与空白组相

比,对照组细胞活力无明显变化;与对照组相比,给予 0.1~100 $\mu\text{mol/L}$ PF 对细胞活力无明显影响。DEX 造模后,与对照组相比,DEX 组细胞活力显著降低($P<0.01$);与 DEX 组比较,PF 对细胞活力具有显著促进作用,尤其是 1 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度 PF 组($P<0.01$)。以上提示 PF 可能具有抑制前成骨细胞凋亡的作用。见图 1。

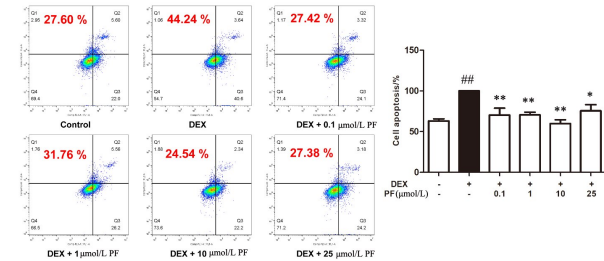


注:与对照组比较,## $P<0.01$,与DEX组比较,* $P<0.05$ 。
 $\bar{x}\pm s,n=6$ 。

图1 PF对MC3T3-E1细胞活力的影响

3.2 PF抑制DEX诱导的MC3T3-E1细胞凋亡

结果显示,与对照组比较,1 μmol/L DEX 诱导后细胞凋亡率显著升高($P<0.01$);与DEX组相比,各浓度PF组均能显著降低细胞凋亡率。以上结果表明PF能够抑制前成骨细胞的凋亡,提示这可能是PF促进成骨分化的原因之一。见图2。

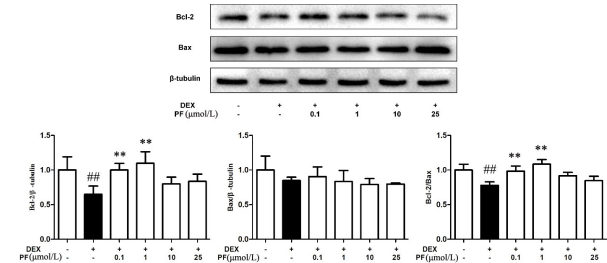


注:Q1.坏死细胞;Q2.晚期凋亡细胞;Q3.早期凋亡细胞;Q4.活细胞。
与对照组比较,## $P<0.01$;与DEX组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
 $\bar{x}\pm s,n=3$ 。

图2 PF对DEX诱导的MC3T3-E1细胞凋亡的影响

3.3 PF升高了Bcl-2/Bax的比率

结果显示,与对照组相比,DEX组的Bcl-2的蛋白表达显著降低($P<0.01$),Bax的蛋白表达有降低趋势但无统计学差异,Bcl-2/Bax的比率显著降低($P<0.01$);给予PF后显著促进了Bcl-2的蛋白表达,同时升高了Bcl-2/Bax的比率,尤其是0.1 μmol/L PF和1 μmol/L PF($P<0.01$)。以上结果表明PF可能通过升高Bcl-2/Bax的比率发挥抗前成骨细胞凋亡的作用。见图3。



注:与对照组比较,## $P<0.01$;与DEX组比较,* $P<0.01$ 。
 $\bar{x}\pm s,n=4$ 。

图3 PF对Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

3.4 PF抑制FoxO3a的核易位

结果显示,与对照组相比,DEX组细胞核内的FoxO3a蛋白表达显著增多;与DEX组相比,给予PF后细胞核内的FoxO3a表达明显减少。以上结果表明PF抗前成骨细胞凋亡可能与抑制FoxO3a的核易位有关。见图4。

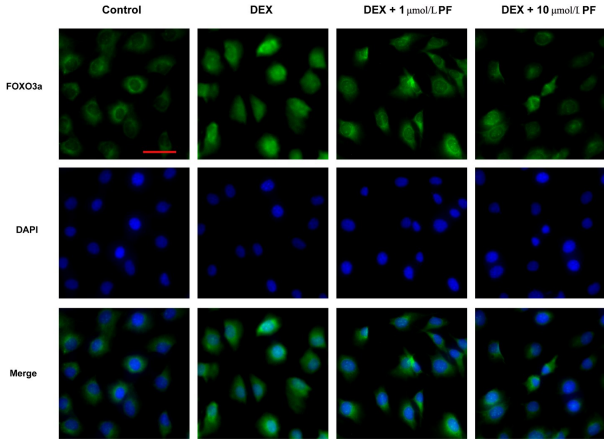
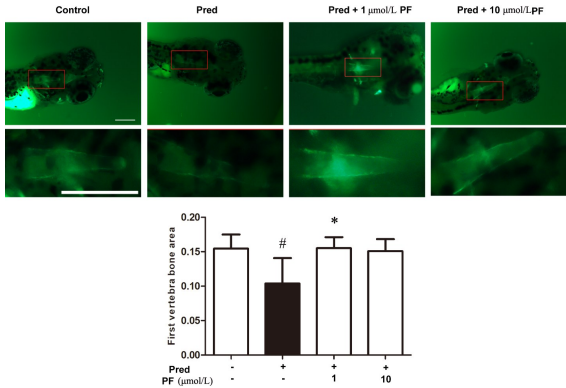


图4 PF对FoxO3a蛋白核易位的影响(×100)

3.5 PF促进Pred诱导斑马鱼骨骼生长

上述结果表明PF具有抗前成骨细胞凋亡的作用,我们用斑马鱼模型观察PF是否对整体动物具有抗OP作用。钙黄绿素染色结果显示,与对照组相比,模型组斑马鱼的第一椎骨的骨骼面积显著降低($P<0.05$),表明造模成功;而与模型组相比,给予PF治疗4 d能增加模型斑马鱼第一椎骨的骨骼面积,尤其是1 μmol/L PF组能够显著改善骨骼面积($P<0.05$)。见图5。



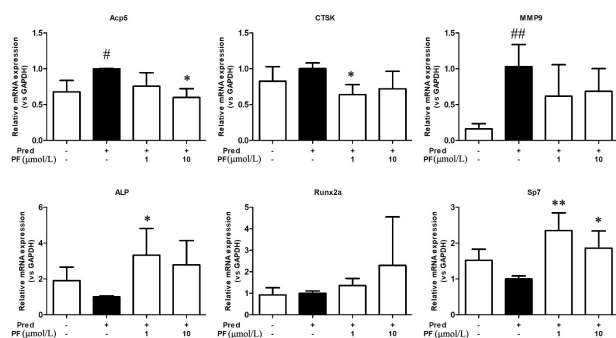
注:红色框内为第一椎骨,下图×80。柱状图为第一椎骨面积。
与对照组比较,## $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。 $\bar{x}\pm s,n=4$ 。

图5 PF对Pred诱导的斑马鱼骨量丢失的干预效应

3.6 PF调控破骨细胞标志基因和成骨细胞标志基因的表达

OP的发生伴随着破骨细胞的增多和成骨细胞的减少,检测破骨细胞和成骨细胞标志基因的mR-

NA 变化有助于反应体内骨吸收和骨形成的变化情况。PCR 结果显示,与对照组相比,模型组破骨细胞标志基因 TRAP(由 Acp5 编码)、CTSK 和 MMP-9 的表达明显升高,尤其是 TRAP 和 MMP-9 的表达显著升高($P<0.05\sim 0.01$);成骨细胞标志基因 ALP 和 Sp7 的表达呈下降趋势,Runx2a 的基因表达无明显变化。与模型组相比,PF 组 TRAP、CTSK 和 MMP-9 的基因表达降低,尤其是 10 $\mu\text{mol/L}$ PF 和 1 $\mu\text{mol/L}$ PF 分别显著抑制了 TRAP 和 CTSK 的基因表达($P<0.05$);ALP、Runx2a 和 Sp7 的基因表达升高,尤其是 1 $\mu\text{mol/L}$ PF 显著促进了 ALP 和 Sp7 的表达($P<0.05\sim 0.01$)。见图 6。



注:与对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;

与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。

图 6 PF 对 Pred 诱导的斑马鱼破骨细胞和成骨细胞标志基因表达的影响

4 讨论

PF 是一种单萜类糖苷化合物,是中药白芍的主要活性成分。现代药理研究表明 PF 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等药理作用,且毒副作用较小,在临床广泛用于治疗炎症相关疾病^[14]。前期研究已证实了 PF 具有抗 OP 作用,多数研究认为该作用主要与抑制骨吸收有关^[8-9]。近来有研究表明 PF 对骨形成也可能存在促进作用^[10],这一新的认识可能使 PF 成为独具特色的 OP 治疗药物。本研究证实了 PF 治疗 OP 这一新的作用途径。基于 PF 的安全有效性,明确其抗 OP 的作用及作用机制,可为临床使用 PF 及白芍治疗 OP 提供进一步的理论依据。

成骨细胞是参与骨形成的关键细胞,并由前成骨细胞分化而来^[1]。OP 发病过程中伴随着成骨细胞的大量凋亡,骨形成显著减少,抑制前成骨细胞的凋亡有助于增加成骨细胞的数目促进骨形成。Bcl-2 家族成员的构成比例被认为是调控凋亡的核心机制之一。抗凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Bax 的比率

是调控细胞生死的关键指标。当 Bcl-2 表达率超过 Bax 时,启动细胞保护作用^[15]。本研究中,我们发现 PF 能够抑制 DEX 诱导的细胞凋亡,并且显著升高了 Bcl-2/Bax 的比率。提示 PF 抗前成骨细胞凋亡可能与升高 Bcl-2/Bax 比率有关。

FoxO 转录因子是细胞响应各种应激刺激的重要调节因子,可通过调节细胞凋亡、DNA 修复、氧化应激和细胞分化等相关基因表达改变细胞存活状态^[16]。FoxO3a 是 FoxO 家族最主要成员,是介导多种细胞凋亡的关键转录因子^[17-19]。FoxO3a 调节细胞凋亡主要与其核定位有关。有研究发现 DEX 能够抑制 AKT 信号通路的激活,当 AKT 信号途径受到抑制时,去磷酸化的 FoxO3a 由细胞质向细胞核内聚集,与促凋亡基因如 Bim 和 FasL 的启动子区域结合,启动细胞凋亡^[20]。最新研究发现 FoxO3a 除能上调促凋亡基因水平,同时可抑制抗凋亡基因 Bcl-2 的表达^[21-22]。本研究发现 MC3T3-E1 细胞经 DEX 刺激后,细胞核内聚集大量的 FoxO3a;给予 PF 后,细胞核内 FoxO3a 表达减少。提示 FoxO3a 的核易位受阻可能是 PF 抑制前成骨细胞凋亡机制之一。

模式生物斑马鱼与人类基因组具有高度同源性,大约 70% 的人类基因中至少有一个明显的斑马鱼直系同源基因^[23]。而斑马鱼骨骼发育机制与哺乳动物具有高度相似性,近年多项研究基于斑马鱼建立了 OP 动物模型^[13,24]。詹杨等^[11]利用糖皮质激素 Pred 诱导建立了斑马鱼幼鱼 OP 模型,并用淫羊藿总黄酮验证了该模型的可行性和高效性。钙黄绿素是一种荧光染料,可与骨中的钙化基质结合,反应骨骼的生长情况。而斑马鱼的透光性使其具备使用该荧光染料标记骨骼组织,实现对骨骼的体内可视化^[25]。成骨细胞是调控骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化等。Runx2 和 Sp7 是调节成骨细胞分化的重要转录因子,其表达水平被视为成骨细胞分化程度的标志。分化成熟的成骨细胞中富含 ALP^[26]。破骨细胞是体内负责骨分解与吸收的唯一细胞,破骨细胞吸附到旧骨质上,分泌酸性物质如 TRAP 溶解矿物质,分泌 CTSK 和 MMP-9 等蛋白酶消化骨基质,形成吸收窝陷^[27-28]。骨形成和骨吸收的动态平衡是维持骨骼的正常发育和形成的关键机制。本研究中我们建立斑马鱼 OP 模型,观察 PF 抗 OP 效应。结果表明 PF 能够显著增加 OP 斑马鱼的骨量,提示了 PF 具有促进骨形成

抑制骨吸收从而改善 OP 的作用。对成骨和破骨均有影响,这与前期研究一致。

综上所述,PF 改善 OP 可能与抑制前成骨细胞凋亡有关,且 PF 抑制细胞凋亡可能与上调 Bcl-2/Bax 比率及抑制 FoxO3a 的核易位有关。本研究证实了 PF 通过促进骨形成治疗 OP 这一新的作用途径,为临床使用 PF 及白芍治疗 OP 提供了依据,并为发现 OP 治疗药物奠定了基础。

参考文献:

- [1] RACHNER TD, KHOSLA S, HOFBAUER LC. New horizons in osteoporosis[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [2] LORENZO J. The many ways of osteoclast activation[J]. J Clin Invest, 2017, 127(7): 2530-2532.
- [3] DAS S, CROCKETT JC. Osteoporosis: A current view of pharmacological prevention and treatment[J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 7: 435-448.
- [4] 郭杨,马勇.中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):188-191.
- [5] ZHANG LL, WEI W, WANG NP, et al. Paeoniflorin suppresses inflammatory mediator production and regulates G protein-coupled signaling in fibroblast-like synoviocytes of collagen induced arthritic rats[J]. Inflamm Res, 2008, 57(8): 388-395.
- [6] ZHANG W, DAI SM. Mechanisms involved in the therapeutic effects of *Paeonia lactiflora* Pallas in rheumatoid arthritis[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(1): 27-31.
- [7] CHEN CW, FAN TY, LI YM, et al. Total glucosides of paeony prevents juxta-articular bone loss in experimental arthritis[J]. BMC Complement Alternat Med, 2013, 13(1): 186.
- [8] LI Z, LI D, CHEN X. Paeoniflorin inhibits receptor activator for nuclear factor κ B (RANK) ligand-induced osteoclast differentiation *in vitro* and particle-induced osteolysis *in vivo* [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 1044-1053.
- [9] XU H, CAI L, ZHANG L, et al. Paeoniflorin ameliorates collagen-induced arthritis via suppressing nuclear factor- κ B signalling pathway in osteoclast differentiation[J]. Immunology, 2018, 154(4): 593-603.
- [10] YEN PH, KIEM PV, NHIEM NX, et al. A new monoterpene glycoside from the roots of *Paeonia lactiflora* increases the differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(10): 1179-1185.
- [11] 詹扬,韦英杰,王长梅,等.淫羊藿总黄酮对泼尼松龙诱导斑马鱼致骨质疏松的防治作用[J].中国医院药学杂志,2014,34(4): 251-255.
- [12] YANG F, LIN ZW, HUANG TY, et al. Ligustilide, a major

bioactive component of *Angelica sinensis*, promotes bone formation via the GPR30/EGFR pathway[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6991.

- [13] VRIEZE ED, KESSEL MAHVJ, PETERS HM, et al. Prednisolone induces osteoporosis-like phenotype in regenerating zebrafish scales[J]. Osteoporos Int, 2014, 25(2): 567-578.
- [14] 冯伟科,郭平.芍药苷药理作用研究进展[J].山东中医杂志, 2019,38(1):105-108.
- [15] 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4): 393-396.
- [16] HUANG H, TINDALL DJ. Dynamic FoxO transcription factors[J]. J Cell Sci, 2007, 120(15): 2479-2487.
- [17] GILLEY J, COFFER PJ, HAM J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons[J]. J Cell Biol, 2003, 162(4): 613-622.
- [18] 隋旭霞,傅玉才,罗丽莉,等.Foxo3a 转录因子参与卵母细胞的凋亡[J].中国现代医学杂志,2007,17(12): 1438-1441.
- [19] 李德渊,屈艺,李晋辉,等.核转录因子 FOXO3a 在新生大鼠缺血缺氧性脑损伤神经元凋亡中的作用[J].中国当代儿科杂志,2013,15(11):1023-1027.
- [20] 张亚楠,陈保民,高阳,等.FoxO3a 转录因子与机体氧化应激损伤的研究进展[J].医学研究生学报,2016,29(3):327-331.
- [21] ZHANG H, ZHANG Z, WANG S, et al. The mechanisms involved in miR-9 regulated apoptosis in cervical cancer by targeting FOXO3[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 626-632.
- [22] DONG H, YE X, ZHONG L, et al. Role of FOXO3 activated by HIV-1 Tat in HIV-associated neurocognitive disorder neuronal apoptosis[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 44.
- [23] HOWE K, CLARK MD, TORROJA CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.
- [24] ZHANG W, XU J, QIU J, et al. Novel and rapid osteoporosis model established in zebrafish using high iron stress[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(2): 654-660.
- [25] BARRETT R, CHAPPELL C, QUICK M, et al. A rapid, high content, *in vivo* model of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Biotechnol J, 2006, 1(6): 651-655.
- [26] IKEBUCHI Y, AOKI S, HONMA M, et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling[J]. Nature, 2018, 561(7722): 195-200.
- [27] KUBATZKY KF, UHLE F, EIGENBROD T. From macrophage to osteoclast- how metabolism determines function and activity[J]. Cytokine, 2018, 112: 102-115.
- [28] KIM K, PUNJ V, KIM JM, et al. MMP-9 facilitates selective proteolysis of the histone H3 tail at genes necessary for proficient osteoclastogenesis[J]. Genes Dev, 2016, 30(2): 208-219.

(编辑:董宇)