

二至丸治疗斑马鱼骨质疏松模型效益观察及破骨细胞自噬机制

田涛^{1,2}, 傅强¹, 朱健奎¹, 尹宏²

(1. 南京中医药大学扬州附属医院, 江苏 扬州 225000; 2. 南京中医药大学附属南京中医院, 江苏 南京 210001)

摘要: **目的** 观察二至丸对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型的治疗疗效, 并明确其对破骨细胞分化的自噬调控机制。 **方法** 选取正常培养 3 d 后活力较好的斑马鱼幼鱼, 用 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙建立斑马鱼骨质疏松症模型, 造模 2 d 后分组, 分为空白组、模型组、依替磷酸二钠(ED)组(300 mg/L)、墨旱莲组(50 $\mu\text{g/mL}$)、女贞子组(50 $\mu\text{g/mL}$)和二至丸组(100 $\mu\text{g/mL}$)。4 d 后, 用 0.2% 钙黄绿素进行染色, 拍照并统计斑马鱼脊椎骨荧光面积; 实时荧光定量 PCR 检测斑马鱼成骨分化基因碱性磷酸酶(ALP)、骨形态发生蛋白 2b(Bmp-2b)、Runx 相关转录因子 2(Runx2)和破骨分化基因组织蛋白酶 K(CTSK)、活化 T 细胞核因子(NFATC-1)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)的表达。培养 RAW264.7 细胞至 80%~90% 密度后分为空白组、LPS 诱导组(10 $\mu\text{g/L}$)、二至丸诱导组(100 $\mu\text{g/mL}$)、墨旱莲诱导组(50 $\mu\text{g/mL}$)和女贞子诱导组(50 $\mu\text{g/mL}$)。经 LPS 诱导细胞破骨分化及药物干预 4 d 后, 实时荧光定量 PCR 检测 RAW264.7 细胞 TRAP、CTSK、NFATC-1 和自噬相关基因 5(ATG5), 泛素结合蛋白 62(p62), 雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和酵母 ATG6 同源物(Beclin)的 mRNA 表达。 **结果** 与空白组比较, 模型组椎骨荧光面积显著减少($P<0.01$), 成骨标志基因表达显著降低($P<0.05\sim 0.01$), 破骨标志基因表达显著升高($P<0.05\sim 0.01$); 与模型组比较, ED 组、女贞子组及二至丸组均显著改善了斑马鱼骨质疏松症($P<0.01$), 且二至丸组显著优于墨旱莲组及女贞子组($P<0.01$)。qPCR 显示相较于空白组, 模型组成骨分化标志物表达显著降低($P<0.05\sim 0.01$), 破骨分化标志物表达显著升高($P<0.05\sim 0.01$)。与模型组比较, ED 组、墨旱莲组、女贞子组及二至丸组成骨标志基因表达显著升高($P<0.05\sim 0.01$), 二至丸组破骨标志基因表达显著降低($P<0.01$)。体外研究显示, LPS 诱导的细胞破骨分化基因 CTSK、TRAP 和 NFATC-1 及自噬相关基因 mTOR、ATG5、Beclin、p62 表达均升高($P<0.01$), 二至丸组、墨旱莲组、女贞子组均可显著降低破骨分化基因和自噬相关基因的表达($P<0.05\sim 0.01$)。 **结论** 二至丸可显著改善斑马鱼骨质疏松模型的临床症状, 其机制可能与通过降低自噬相关基因表达从而抑制破骨细胞分化有关。

关键词: 斑马鱼; 骨质疏松; 二至丸; 自噬

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2020)03-0352-06

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0352

引文格式: 田涛, 傅强, 朱健奎, 等. 二至丸治疗斑马鱼骨质疏松模型效益观察及破骨细胞自噬机制[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 352-357.

Observation on the Effect of Erzhiwan on Zebrafish Osteoporosis Model and Study on Autophagy Mechanism of Osteoclast

TIAN Tao^{1,2}, FU Qiang¹, ZHU Jian-kui¹, YIN Hong²

(1. Yangzhou Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Yangzhou, 225000, China; 2. Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the treatment efficacy of Erzhiwan on prednisolone-induced osteoporosis of zebrafish model and to clarify its regulation of autophagy mechanism on osteoclast differentiation. **METHODS** The young zebrafishes of good energy after 3 days, normal development were selected. The zebrafish osteoporosis model was established with 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone. The zebrafishes were divided into control group, model group, etidronate disodium group (300 mg/L), Mohanlian group (50 $\mu\text{g/mL}$), Nvzhenzi group (50 $\mu\text{g/mL}$) and Erzhiwan group (100 $\mu\text{g/mL}$). After 4 days, the calcein staining was adopted to measure the vertebral bone fluorescence area of zebrafish; qPCR was adopted to detect the osteogenic marker genes ALP, BMP-2b, Runx2 and osteoclast marker genes CTSK, TRAP, NFATC-1 expression. RAW264.7 cells were divided into control, LPS induction (10 $\mu\text{g/L}$), EZW(100 $\mu\text{g/mL}$), MHL(50 $\mu\text{g/mL}$), and NZZ group (50 $\mu\text{g/mL}$) after they were cultured to 80%~90% density. The mRNA expression of TRAP, CTSK and autophagy-related genes 5 (ATG5), ubiquitin-binding protein 62 (p62), mammalian target of rapamycin(mTOR), and Beclin were detected by qPCR. **RESULTS** Compared with the control group, the model group had significant declines in both vertebral bone fluorescence area

收稿日期: 2019-12-28

基金项目: 国家自然科学基金(81774335)

第一作者: 田涛, 男, 副主任医师, E-mail: tt9602net@163.com

通信作者: 尹宏, 男, 教授, 主任医师, 主要从事创伤骨折、关节、脊柱疾病研究, E-mail: hongy6011@163.com

and osteogenic marker gene expression and had significant rise in osteoclast marker genes($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the ED group, the Nvzhenzi group and the Erzhiwan group all remarkably improved zebrafish osteoporosis and acted better than both Mohanlian group and Nvzhenzi group($P<0.01$). qPCR showed that compared with the control group, the model group's osteogenic marker gene expression significantly declined and osteoclast marker genes rose conspicuously($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with model group, the ED group, Mohanlian group and the Nvzhenzi group as well as Erzhiwan group had osteogenic marker gene expression rose significantly($P<0.05$, $P<0.01$), and Erzhiwan group has osteoclast marker genes reduced significantly($P<0.01$). The *in-vitro* study showed that the expression of osteoclast marker genes CTSK, TRAP, ATG5 and NFATC-1 induced by LPS as well as autophagy-related genes mTOR, ATG5, Beclin, p62 all rose($P<0.01$). The Erzhiwan group, Mohanlian group and Nvzhenzi group significantly decreased the expressions of osteoclast marker genes and autophagy-related genes($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Erzhiwan can significantly improve the clinical symptoms of osteoporosis in zebrafish model, its mechanism may be related to the inhibition of the osteoclast-differentiation by reducing autophagy-related gene expressions.

KEYWORDS: zebrafish; osteoporosis; Erzhiwan; autophagy

骨质疏松是一种以全身性骨量减少、骨微结构破坏为特征的代谢性疾病,患者骨骼脆性增加,骨折风险较正常人显著提高^[1]。目前普遍认为骨质疏松症主要病理机制是破骨细胞活性增高,骨吸收亢进,骨形成与骨吸收平衡被打破,进而引起骨骼病变^[2]。骨质疏松症可分为原发性骨质疏松和继发性骨质疏松。原发性骨质疏松包括绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松,多由雌激素减少和老龄化引起。继发性骨质疏松一般具有明确的病原学机制,如糖皮质激素过量或甲亢等^[3]。目前临床上多用钙剂、骨质吸收抑制剂和雌激素等对骨质疏松进行治疗,但均有不同程度的副作用^[4-6]。

骨质疏松属中医学“骨痿”的范畴,中医学认为肾主骨,肾虚髓亏、骨髓生化乏源,故骨脆易折。临床上常用补肾填精的方药治疗。二至丸首见于明代吴崑《扶寿精方》,由女贞子与墨旱莲二药组成,具有滋补肝肾、强壮腰膝的作用^[7]。现代药理学研究表明,其主要成分为三萜类、环烯醚萜类、黄酮类、苯醇类、木脂素类、芳杂环类、生物碱类、甾醇等^[8],临床报道显示二至丸具有改善骨质疏松症的作用,然而其作用的主要机制尚未明确^[9]。本研究拟通过建立斑马鱼骨质疏松模型,观察二至丸对斑马鱼骨质疏松模型的影响,并探索二至丸改善骨质疏松的潜在机制。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 泼尼松龙(Prednisolone, Pred)(上海源叶生物有限公司,批号:T20J7H9291),依替膦酸二钠(ED),钙黄绿素(上海源叶生物有限公司,批号:K22A8M34493, S19167),三卡因(SIGMA-ALDRICH 中国,批号:MKBV1603V),墨旱莲、女贞子均来源于江苏省中医院制剂室并经南京中医药大学药学院刘圣金副教

授鉴定。墨旱莲组:墨旱莲(6 g),女贞子组:女贞子(6 g),二至丸组:墨旱莲(6 g)+女贞子(6 g)。分别称取上述药材各5倍处方量,经粉碎至40目,5倍量水回流提取2 h,再4倍量水回流提取1.5 h,合并2次提取液,减压浓缩,制备成墨旱莲及女贞子单药生药量1 g/mL,二至丸复方1 g/mL。4℃冷藏备用。逆转录试剂盒(Vazyme,批号:R223-01-AB, R223-01-AC),扩增试剂盒(Vazyme,批号:MIX: Q111-02-AA),无酶水(Vazyme,批号:R223-01-AA)。DMEM培养基(GIBCO,货号:12800017)。脂多糖(Sigma-aldrich,货号:L-2630)。TRAP染色试剂盒(Sigma-aldrich,货号:387A-1KT)PCR引物由南京金斯瑞生物科技有限公司设计并合成。引物序列见表1。

1.1.2 实验动物及细胞 受精后1 d(1 dpf)的AB品系斑马鱼,购于南京一树梨花生物科技有限公司。实验过程严格遵守《实验动物管理与使用指南》。斑马鱼饲养条件为昼夜节律为昼:夜=14 h:10 h;温度为 $(28.5\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 。购回后适应性饲养2 d,即得3 dpf斑马鱼。小鼠前破骨细胞系RAW264.7细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.1.3 实验仪器 体式荧光显微镜(德国Leica公司,型号:M205FA);高通量多样品组织研磨仪(南京乔贝琳生物科技有限公司,型号:Tissuelyser-48);酶标仪(Biotek,型号:Synergy2),实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems,型号:7500);定量病理成像分析系统(PerkinElmer,型号:5417R)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼药物浓度筛选 随机选取3 dpf正常斑马鱼置于六孔板中,每孔(组)20尾,分别给予墨旱莲(50、100、200 $\mu\text{g/mL}$),女贞子(50、100、200 $\mu\text{g/mL}$),二至丸(100、200、400 $\mu\text{g/mL}$),每孔给予3 mL培养基,同时设置空白对照组、泼尼松龙

(25 $\mu\text{mol/L}$)模型药组及依替磷酸二钠(300 mg/L)阳性药组。28 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱昼夜孵育持续 9 d。记录每日斑马鱼死亡数量,统计每组总体死亡率,确定墨旱莲、女贞子及二至丸对斑马鱼的最适浓度。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
ALP	GGCCTTACATGAAGCTGTGG	3 712
	GTTTCCTCGTGGTGTGTAGC	
Bmp-2b	CGGTCAACTCCAACATTCCC	2 001
	ATTGTTCTCATCGGCAACCG	
unx2	GTGGAGATCATAGCGGACCA	1 750
	CTCCAGAGCCACAACCTTA	
CTSK	CGTCACTTCGGTGAAGAACC	1 595
	ACAGTCCA-CCAGGTTCTGAG	
TRAP	GGCGAAGTC-CAAAGCTGATT	1 690
	CGGATATGGACCACACTGGA	
NFATC-1	CCAAGGTGGTGTGTTGTGGAG	2 991
	CTGGCTTCTCTCCGCTTTC	
GAPDH	TGGTGCTGGTATTGCTCTCA	1 329
	ATGGGAGAATGGTCGCGTAT	
CTSK	CAGTAGCCACGCTTCTCTATCC	1 583
	ACTGGGTGTCCAGCATTTCC	
TRAP	CTGAACACCACGAGAGTCCT	1 683
	TCAGTTGGTGTGGGCATACT	
ATG5	GGAACCACCTTGAGTCAGGA	2 317
	AGTG-GTCCTGTGTGTCTCAG	
mTOR	ACTGTGCCAGAATCCATCCA	8 612
	ATAAGCAGCTCCACTTGGGT	
Beclin	ATTGGACCAGGAGGAAGCTC	2 004
	CACCTGGTTCTCCACACTCT	
p62	CCTGCCTTCCGTCTTCTGTA	1 916
	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	
GAPDH	GGTTGT-CTCCTGCGACTTCA	1 296
	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	

1.2.2 斑马鱼骨质疏松模型治疗效果评价 选取健康的 3 dpf 的斑马鱼随机分为 5 组,置于 6 孔板中,每孔 3 mL 培养基,分组及给药如下:Control 组、Model 组 (25 $\mu\text{mol/L}$ Pred)、ED 组 (300 mg/L)、墨旱莲组、女贞子组和二至丸组。从 3 dpf 开始,Control 组加入含 0.1% DMSO 的培养基,其余各组加入含 25 $\mu\text{mol/L}$ Pred 培养基(含 0.1% DMSO)。从 5 dpf 开始给药,Control 组、Model 组及 ED 组条件不变,墨旱莲组给予含 25 $\mu\text{mol/L}$ Pred 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 墨旱莲含药培养基,女贞子组给予含 25 $\mu\text{mol/L}$ Pred 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 女贞子含药培养基,二至丸组给予含 25 $\mu\text{mol/L}$ Pred 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 二至丸含药培养基,所有组别均含 0.

1% DMSO。连续给药 4 d,于第 9 dpf 取 20 尾形态正常斑马鱼进行钙黄绿素染色拍照,而后使用 Image J 19 统计每尾斑马鱼幼鱼头骨及椎骨荧光面积;另取 20 尾提取 RNA 并完成相关基因检测。

1.2.3 MTT 比色法检测 RAW264.7 细胞活力 取生长良好的 RAW264.7 细胞于种板后 24 h 按药物比例分组并给药:空白组、墨旱莲组(1、10、50、100、200、400、600、800、1 000 mg/L)、女贞子组(1、10、50、100、200、400、600、800、1 000 mg/L)及二至丸组(1、10、50、100、200、400、600、800、1 000 mg/L),每组重复 6 个复孔,于给药后 48 h 采用 MTT 法检测细胞活力。

1.2.4 qPCR 检测各基因表达 斑马鱼幼鱼于第 9 dpf 用 Trizol 裂解液提取其 RNA,并测定 RNA 浓度;RAW264.7 细胞分组及给药方式同前,干预 4 d 后提取各组 RNA 并测定 RNA 浓度。逆转录反应体系:RNA + RNase-Free Water = 12 μL , 4 $\times$ gDNA 4 μL /管,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s;5 $\times$ Hiscript II 4 μL 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s。总体积 20 μL ,−20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。引物序列:由金斯瑞生物科技有限公司(南京)设计并合成。检测指标包括 Runx2, Bmp-2b, ALP, TRAP, CTSK, NFATC-1, ATG5, p62, mTOR, TRAP 及 Beclin;扩增反应体系为 20 μL ,反应条件:2 $\times$ Ace qPCR SYBR Green Master Mix 10.0 μL , 50 $\times$ ROX Reference Dye 2 0.4 μL , Forward Primer (10 μL) 0.8 μL , Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , ddH₂O 6 μL , cDNA 2 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,进行 40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 再变性 15 s 以绘制融解曲线,计算各基因相对表达水平并进行统计分析。

1.2.5 数据处理与分析 所有数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有统计结果均用 GraphPad Prism 5.0 分析,使用 one-way ANOVA 及 t 检验进行统计, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

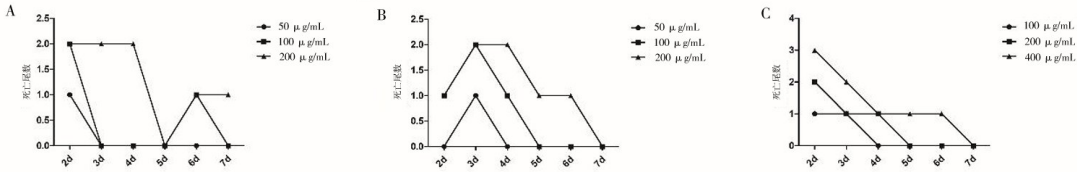
2 结果

2.1 药物安全性评价

通过加入不同浓度的药物观察并统计药物不同浓度对斑马鱼生长发育的影响。结果显示,墨旱莲在 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下斑马鱼死亡尾数较多,而在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下死亡尾数最少;女贞子在 100 $\mu\text{g/mL}$ 与 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下死亡尾数较多,在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下死亡尾数最少;二至丸在

400 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下死亡尾数较多,在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下死亡尾数最少。根据二至丸药物构成比例(墨旱莲:女贞子=1:1),故选择墨旱莲(50 $\mu\text{g/mL}$),

女贞子(50 $\mu\text{g/mL}$),二至丸(100 $\mu\text{g/mL}$)为斑马鱼正常生长发育的最适浓度。见图 1。

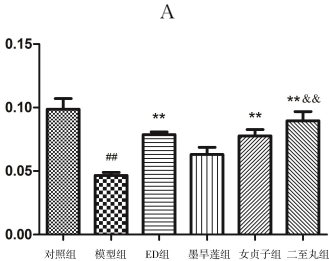
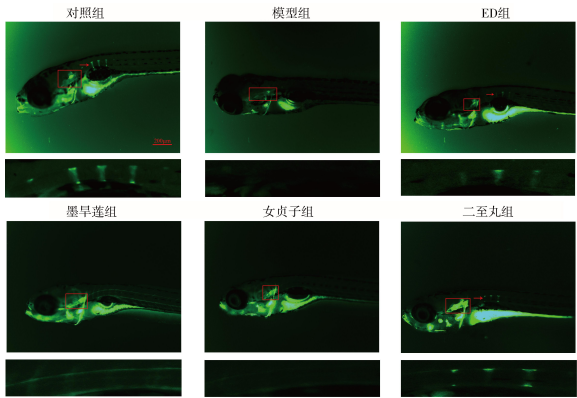


A. 斑马鱼在墨旱莲不同浓度下 7 d 内死亡尾数;B. 斑马鱼在女贞子不同浓度下 7 d 内死亡尾数;C. 斑马鱼在二至丸不同浓度下 7 d 内死亡尾数。

图 1 斑马鱼最适药物浓度筛选

2.2 二至丸抗骨质疏松活性评价

通过持续 4 d 给予骨质疏松模型斑马鱼最适浓度的墨旱莲、女贞子及二至丸后,观察并评价 3 组方药抗骨质疏松活性。研究发现,钙黄绿素对骨中钙离子敏感性较强,且其无毒性也更加适合观察斑马鱼骨骼的发育^[10]。本研究通过钙绿素染色统计斑马鱼头骨与椎骨荧光面积发现,与空白对照组相比,模型组骨骼荧光面积均显著减少,提示斑马鱼骨质疏松模型构建良好。与模型组比较,阳性药组、女贞子组及二至丸组骨骼荧光面积均显著增加,且二至丸组骨骼增加面积显著高于墨旱莲组,但与女贞子组无明显差异。表明二至丸可以有效改善斑马鱼骨质疏松症。见图 2。

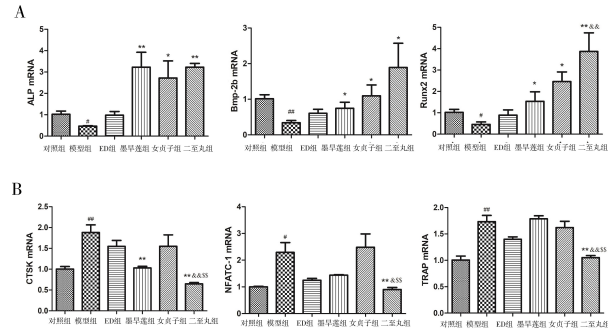


A. 斑马鱼幼鱼(9 dpf)钙黄绿素染色($\times 50$)及其椎骨放大图;B. 斑马鱼幼鱼头骨及椎骨荧光面积统计。与空白组比较, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与墨旱莲组比较, $^{&}&P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s,n=6$ 。

图 2 药物抗骨质疏松活性评价

2.3 二至丸方对成骨及破骨相关基因表达的影响

qPCR 法检测各组斑马鱼给药后成骨及破骨相关基因的表达。结果显示,与空白组相比,模型组成骨标志基因碱性磷酸酶(ALP)、骨形态发生蛋白 4 (Bmp-2b)和 Runt 相关转录因子 2(Runx2)表达均显著降低,破骨标志基因组织蛋白酶 K(CTSK)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)和活化 T 细胞核因子(NFATC-1)表达显著升高。与模型组比较,ED 组、墨旱莲组、女贞子及二至丸组成骨标志基因表达显著升高,二至丸组破骨标志基因显著降低,且相较于墨旱莲组及女贞子组,二至丸组更加促进了 Runx2 基因表达,降低了 CTSK、TRAP 及 NFATC-1 基因表达。提示相较于墨旱莲与女贞子,二至丸更加有效的增加了骨质疏松斑马鱼成骨标志基因表达,降低了破骨相关基因表达。见图 3。



A. 斑马鱼幼鱼(9 dpf)成骨标志基因 ALP,BMP-2b,Runx2 表达; B. 斑马鱼幼鱼(9 dpf)破骨标志基因 CTSK,TRAP,NFATC-1 表达。与空白组比较, $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与墨旱莲组比较, $^{&}&P<0.05$, $^{&&}&P<0.01$;与女贞子组比较, $^{&&&}&P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s,n=6$ 。

图 3 药物对斑马鱼成骨及破骨标志基因表达的影响

2.4 二至丸对 RAW264.7 细胞增殖的影响

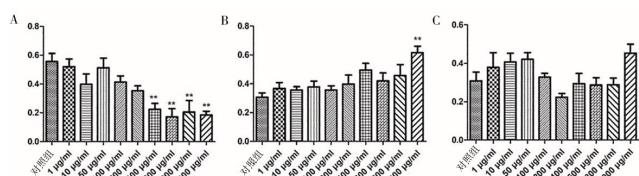
药物干预 24 h 后 MTT 法检测各组细胞活力。与空白组相比,RAW264.7 细胞在墨旱莲组 200 $\mu\text{g/mL}$ 及更高浓度下细胞活力显著下降;在女贞子组 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 及更高浓度下细胞活力显著提

高;不同药物浓度对二至丸组细胞活力影响不明显。与模型组相比,在墨旱莲组 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下细胞活力未见明显差异,故选取墨旱莲 50 $\mu\text{g/mL}$ 作为参照。根据二至丸药物构成比例,选择墨旱莲 50 $\mu\text{g/mL}$,女贞子 50 $\mu\text{g/mL}$,二至丸 100 $\mu\text{g/mL}$ 为对 RAW264.7 细胞活力无明显影响的最适浓度。见图 4。

2.5 二至丸对 RAW264.7 破骨分化的影响

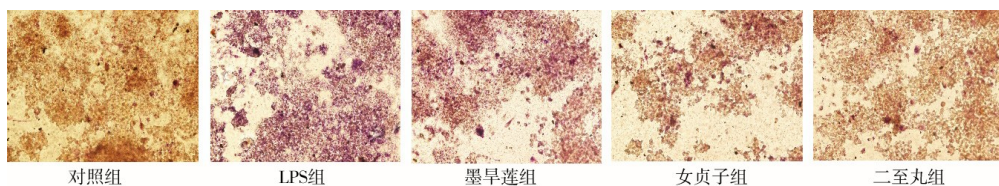
与空白组相比,LPS 诱导组 TRAP 染色颜色明显加深,TRAP 阳性细胞(紫红色)显著增加。与模型组相比,墨旱莲组与女贞子组 TRAP 阳性细胞数量有下降趋势,二至丸组 TRAP 阳性细胞数量显著

减少。提示二至丸可有效抑制破骨细胞分化水平。见图 5。



注:A. RAW264.7 在墨旱莲组不同浓度梯度下的细胞活力;B. RAW264.7 在女贞子组不同浓度梯度下的细胞活力;C. RAW264.7 在二至丸组不同浓度梯度下的细胞活力。与空白组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 4 MTT 筛选 RAW264.7 适宜药物浓度



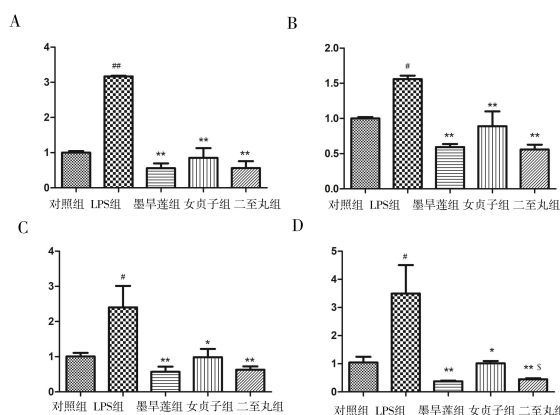
A. 空白组;B. LPS 诱导组;C. 墨旱莲组;D. 女贞子组;E. 二至丸组

图 5 药物对细胞形态学的影响(TRAP 染色, $\times 200$)

2.6 二至丸对 RAW264.7 破骨分化标志基因表达的影响

qPCR 法检测各组细胞经药物干预后破骨分化基因的表达。与空白组相比,LPS 诱导的细胞 CTSK、NFATC-1、TRAP 表达显著升高。与模型组相比,墨旱莲组、女贞子组与二至丸组 CTSK、NFATC-1、TRAP 表达均显著降低。提示二至丸可通过降低破骨分化标志基因从而抑制破骨细胞分化。见图 6。

p62 基因表达。提示二至丸可通过抑制自噬相关基因表达减少破骨细胞分化,抑制骨吸收,促进骨的代谢水平达到稳态。见图 7。

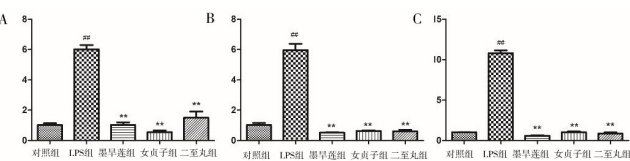


A. 各组自噬相关基因 mTOR 的表达;B. 各组自噬相关基因 ATG5 的表达;C. 各组自噬相关基因 Beclin 的表达;D. 各组自噬相关基因 p62 的表达。与空白组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与女贞子组比较, $^{\$}P<0.05$ 。

图 7 药物对 RAW264.7 细胞自噬相关基因表达的影响

3 讨论

肾为先天之本,主骨,与骨的生长密切相关。骨质疏松属于祖国医学“骨痿”范畴,历代医家常从滋补肝肾入手治疗该病且疗效确切。近年关于二至丸防治骨质疏松症的研究有大量的文献报道,并取得了一定的成果。二至丸由女贞子和墨旱莲 2 味中药组成,具有补肾壮骨之功。临床报道证实了二至丸



A. 各组破骨分化基因 CTSK 的表达;B. 各组破骨分化基因 NFATC-1 的表达;C. 各组破骨分化基因 TRAP 的表达。与空白组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 6 药物对 RAW264.7 细胞破骨分化基因表达的影响

2.7 二至丸对自噬相关基因表达的影响

qPCR 法检测各组细胞经药物干预后自噬相关基因的表达。与对照组相比,LPS 诱导组中 mTOR、ATG5、Beclin 和 p62 表达显著提高。与 LPS 诱导组相比,墨旱莲组与二至丸组均显著抑制 mTOR、ATG5、Beclin 和 p62 表达;女贞子组 mTOR、ATG5 表达显著降低,Beclin、p62 表达明显降低,且相较于女贞子组,二至丸组更显著的抑制了

对于骨质疏松治疗具有明显的疗效^[11-12],但其更深层次的机制尚不明确,有待进一步探究。

骨代谢标志物可以较直观的体现骨代谢水平与特征。ALP、Bmp-2b、Runx2、CTSK、TRAP 与 NFATC-1 是骨吸收与骨再生状态的骨代谢标志物,其中 ALP、Bmp-2b、Runx2 反应成骨细胞的功能,是评价成骨细胞活性的关键基因,当这些基因表达增高,成骨细胞的活动增强,反之则降低。CTSK、TRAP、NFATC-1 是体现破骨细胞活性与骨吸收状态的重要指标,骨吸收过程中可大量释放这些基因,当破骨细胞活性下降时则表达下降。

自噬是细胞内主要的降解系统,细胞质通过该系统被递送至溶酶体并在溶酶体中降解^[13]。自噬作为一种动态的回收系统,为细胞更新和体内平衡产生新的能量奠定基础,当机体受到创伤、慢性疾病等应激作用时自噬水平会显著提高。现有研究表明,以骨量流失为特征的骨质疏松等代谢性疾病与自噬作用被抑制密切相关^[14]。在机体自噬作用过程中,Beclin、p62、mTOR 与 ATG5 发挥了关键作用。Beclin-1 是自噬启动的必要因素,在自噬过程起修饰作用,自噬选择底物 p62 是反映细胞存活和细胞凋亡的多功能信号分子^[15]。Beclin/P62 复合物是调控自噬的关键因子之一。目前已知的 ATG 蛋白共有 41 种,其中 ATG5 对于自噬囊泡的形成是必不可少的^[16]。ATG5 可调节肌动蛋白环来增强破骨细胞活性,从而促进骨吸收^[17]。mTOR 是自噬的重要调节因子,当两者表达水平提高时,机体自噬作用增强,破骨细胞活性上升并分泌溶酶体与盐酸定向降解机体骨骼^[18]。种种迹象表明,自噬作用是骨质疏松的病理机制的重要一环。

本研究验证了墨旱莲、女贞子与二至丸治疗骨质疏松的疗效。在体实验表明二至丸、墨旱莲、女贞子可通过向上调节斑马鱼骨质疏松模型成骨细胞标志基因表达,促进骨形成,增加机体骨量;同时墨旱莲和二至丸亦可向下调节破骨细胞标志基因表达,抑制骨吸收。进一步的离体实验表明自噬作用在破骨细胞分化过程中明显增强,而二至丸可显著降低破骨细胞自噬相关基因的表达,从而抑制破骨细胞分化成熟并降低骨吸收水平,改善骨质疏松的相关症状。本研究通过建立斑马鱼骨质疏松模型验证了

二至丸的抗骨质疏松活性,明确了其通过降低自噬基因表达水平抑制破骨细胞分化的作用机制,其更深层次的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] THAYER SW, STOLSHEK BS, GOMEZ REY G, et al. Impact of osteoporosis on high-cost chronic diseases[J]. Value Health, 2014, 17(1): 43-50.
- [2] WRIGHT NC, LOOKER AC, SAAG KG, et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(11): 2520-2526.
- [3] TU KN, LIE JD, WAN CKV, et al. Osteoporosis: A review of treatment options[J]. Pharm Therap, 2018, 43(2): 92.
- [4] CAMACHO PM, PETAK SM, BINKLEY N, et al. American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis - 2016 [J]. Endocr Pract, 2016, 22(Suppl 4): 1-42.
- [5] COSMAN F, DE BEUR SJ, LEBOFF MS, et al. Erratum to: Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(7): 2045-2047.
- [6] BUCKLEY L, GUYATT G, FINK HA, et al. 2017 American college of rheumatology guideline for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2017, 69(8): 1095-1110.
- [7] 蔡秀江, 黄美艳, 丁安伟, 等. 二至丸考源及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 272-275.
- [8] 林雄浩, 吴锦忠. 中药复方二至丸的化学成分及抗骨质疏松研究进展[J]. 解放军药学报, 2009, 25(5): 421-424.
- [9] 徐森楠, 庄莉, 翟园园, 等. 基于网络药理学研究二至丸防治骨质疏松症的物质基础与作用机制[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(22): 1913-1920.
- [10] DU SJ, FRENKEL V, KINDSCHI G, et al. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein[J]. Dev Biol, 2001, 238(2): 239-246.
- [11] 俞益火, 陈久毅, 王建. 二至丸治疗绝经后骨质疏松症的疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(4): 42-43.
- [12] 胡科. 二至丸对骨质疏松性股骨颈骨折术后愈合及髋关节功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(4): 384-386.
- [13] GIRICZ Z, MENTZER RM, GOTTLIEB RA. Autophagy, myocardial protection, and the metabolic syndrome[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 60(2): 125-132.
- [14] OWEN HC, VANHEES I, GUNST J, et al. Critical illness-induced bone loss is related to deficient autophagy and histone hypomethylation[J]. Intensive Care Med, 2015, 3(1): 52.
- [15] AU AK, ANEJA RK, BAYIR H, et al. Autophagy biomarkers beclin 1 and p62 are increased in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury[J]. Neurocrit Care, 2017, 26(3): 348-355.
- [16] MAUTHE M, REGGIORI F. ATG proteins: Are we always looking at autophagy? [J]. Autophagy, 2016, 12(12): 2502-2503.
- [17] YE X, ZHOU XJ, ZHANG H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2334.
- [18] LINDER M, HECKING M, GLITZNER E, et al. EGFR controls bone development by negatively regulating mTOR-signaling during osteoblast differentiation[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(6): 1094-1106.

(编辑:董宇)