

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research β -谷甾醇调控 TGF- β 1/Smad3 通路对骨髓
间充质干细胞成骨分化影响的研究Research on the effect of β -sitosterol on osteogenic differentiation of bone marrow
mesenchymal stem cells by regulating the TGF- β 1/Smad3 pathway田 甜^a, 李 刚^b,
王 磊^c, 李伟华^a(济南市人民医院 a. 药剂科; b. 科教科;
c. 医务科 山东 济南 271100)TIAN Tian^a, LI Gang^b,
WANG Lei^c, LI Wei-hua^a(a. Department of Pharmacy; b.
Department of Science and Education;
c. Department of Medical Affairs, Jinan
People's Hospital, Jinan 271100,
Shandong Province, China)基金项目:山东省医药卫生科技发展计划基金
资助项目(202002040822);济南市科
技创新发展计划基金资助项目
(202134050)作者简介:田甜(1982-),女,主管药师,主要
从事药学基础研究工作

通信作者:李伟华,主任药师

MP:13127269969

E-mail:361161637@qq.com

摘要:目的 探讨 β -谷甾醇调控转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/果蝇母体抗脑脊髓瘫痪同源物3(Smad3)通路对骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的影响。
方法 将BMSCs随机分为对照组、 β -谷甾醇低中剂量组、高剂量实验组,对照组正常培养,低、中、高剂量组分别以1.50、3.0、6.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预。将BMSCs随机分为对照组、 β -谷甾醇组(6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -谷甾醇)、Smad3抑制剂(SIS3)组(5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SIS3)、 β -谷甾醇+ SIS3组(6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -谷甾醇+5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SIS3)。以酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定各组碱性磷酸酶(ALP)活性,以茜素红染色测定各组钙沉积率;以蛋白质印迹(Western blot)法检测各组BMSCs成骨分化与TGF- β 1/Smad3通路相关蛋白表达。
结果 β -谷甾醇低、中、高剂量组和对照组的ALP活性分别为(1.24 $\pm$ 0.10)、(1.53 $\pm$ 0.08)、(1.84 $\pm$ 0.11)和(0.95 $\pm$ 0.09) $\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$;钙沉积率分别为(196.21 $\pm$ 13.67)%、(301.73 $\pm$ 16.90)%、(423.60 $\pm$ 20.25)%和(100.00 $\pm$ 0)%;骨形态发生蛋白2(BMP-2)蛋白相对表达水平分别为0.49 $\pm$ 0.05、0.89 $\pm$ 0.07、1.30 $\pm$ 0.09和0.13 $\pm$ 0.02;TGF- β 1蛋白相对表达水平分别为0.47 $\pm$ 0.04、0.85 $\pm$ 0.07、1.26 $\pm$ 0.09和0.10 $\pm$ 0.01;p-Smad3/Smad3蛋白相对表达水平分别为0.32 $\pm$ 0.03、0.59 $\pm$ 0.06、0.94 $\pm$ 0.05和0.08 $\pm$ 0.02。 β -谷甾醇低、中、高剂量组上述指标与对照组比较均显著升高,并呈剂量依赖性,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。 β -谷甾醇组、SIS3组、 β -谷甾醇+ SIS3组和对照组的ALP活性分别为(1.78 $\pm$ 0.14)、(0.43 $\pm$ 0.08)、(0.97 $\pm$ 0.13)和(0.91 $\pm$ 0.10) $\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$;钙沉积率分别为(410.35 $\pm$ 19.72)%、(45.62 $\pm$ 13.91)%、(109.14 $\pm$ 16.53)%和(100.00 $\pm$ 0)%;BMP-2蛋白相对表达水平分别为1.79 $\pm$ 0.16、0.27 $\pm$ 0.07、0.87 $\pm$ 0.10和0.85 $\pm$ 0.11;TGF- β 1蛋白相对表达水平分别为1.47 $\pm$ 0.10、0.11 $\pm$ 0.03、0.56 $\pm$ 0.09和0.55 $\pm$ 0.06;p-Smad3/Smad3蛋白相对表达水平分别为0.94 $\pm$ 0.06、0.09 $\pm$ 0.02、0.45 $\pm$ 0.05和0.43 $\pm$ 0.04。 β -谷甾醇组上述指标与对照组比较均显著升高,而SIS3组均显著降低,在统计学上差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。 β -谷甾醇+ SIS3组上述指标与 β -谷甾醇组比较均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。
结论 β -谷甾醇可通过激活TGF- β 1/Smad3通路促进BMSCs成骨分化。

关键词: β -谷甾醇;TGF- β 1/Smad3;骨髓间充质干细胞;成骨分化

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.20.009

中图分类号:R966

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)20-2899-07

Abstract: Objective To investigate the effect of β -sitosterol on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by regulating the transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)/

mothers against decapentaplegic drosophila homolog 3 (Smad3) pathway. **Methods** BMSCs were randomly assigned into control group, low - dose β - sitosterol (β - sitosterol - L) group, medium - dose β - sitosterol group (β - sitosterol - M), and high - dose β - sitosterol group (β - sitosterol - H). Control group was cultured normally and β - sitosterol - L, - M and - H group was intervened by 1.5、3.0、6.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β - sitosterol. BMSCs were randomly divided into control group (normal culture), β - sitosterol group (6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β - sitosterol), SIS3 group (5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SIS3), and β - sitosterol + SIS3 group (6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β - sitosterol + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SIS3). Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the alkaline phosphatase (ALP) activity was measured in each group. Alizarin red staining was used to determine the calcium deposition rate of each group, and then the osteogenic differentiation of BMSCs in each group was detected. Western blot was used to detect the osteogenic differentiation of BMSCs and the expression of TGF - β 1/Smad3 pathway related proteins in each group. **Results** The ALP activities of the β - sitosterol - L, β - sitosterol - M, β - sitosterol - H and the control groups were (1.24 $\pm$ 0.10), (1.53 $\pm$ 0.08), (1.84 $\pm$ 0.11) and (0.95 $\pm$ 0.09) U $\cdot$ mg prot $^{-1}$, respectively; the calcium deposition rates were (196.21 $\pm$ 13.67)%, (301.73 $\pm$ 16.90)%, (423.60 $\pm$ 20.25)% and (100.00 $\pm$ 0)%, respectively; the relative expression levels of bone morphogenetic protein 2 (BMP - 2) protein were 0.49 $\pm$ 0.05, 0.89 $\pm$ 0.07, 1.30 $\pm$ 0.09 and 0.13 $\pm$ 0.02, respectively; the relative protein expression of TGF - β 1 were 0.47 $\pm$ 0.04, 0.85 $\pm$ 0.07, 1.26 $\pm$ 0.09 and 0.10 $\pm$ 0.01, respectively; the p - Smad3/Smad3 values were 0.32 $\pm$ 0.03, 0.59 $\pm$ 0.06, 0.94 $\pm$ 0.05 and 0.08 $\pm$ 0.02, respectively. Compared with the control group, the above indicators of the β - sitosterol - L, β - sitosterol - M and β - sitosterol - H groups showed an increase in a dose - dependent manner, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The ALP activities of the β - sitosterol group, SIS3 group, β - sitosterol + SIS3 group and the control group were (1.78 $\pm$ 0.14), (0.43 $\pm$ 0.08), (0.97 $\pm$ 0.13) and (0.91 $\pm$ 0.10) U $\cdot$ mg prot $^{-1}$, respectively; the calcium deposition rates were (410.35 $\pm$ 19.72)%, (45.62 $\pm$ 13.91)%, (109.14 $\pm$ 16.53)% and (100.00 $\pm$ 0)%, respectively; the relative expression levels of BMP - 2 protein were 1.79 $\pm$ 0.16, 0.27 $\pm$ 0.07, 0.87 $\pm$ 0.10 and 0.85 $\pm$ 0.11, respectively; the relative protein expression levels of TGF - β 1 were 1.47 $\pm$ 0.10, 0.11 $\pm$ 0.03, 0.56 $\pm$ 0.09 and 0.55 $\pm$ 0.06, respectively; The p - Smad3/Smad3 values were 0.94 $\pm$ 0.06, 0.09 $\pm$ 0.02, 0.45 $\pm$ 0.05 and 0.43 $\pm$ 0.04, respectively. Compared with the control group, the above indicators were all increased in the β - sitosterol group, while they were all decreased in the SIS3 group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Compared with the β - sitosterol group, the above indicators were all decreased in the β - sitosterol + SIS3 group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** β - sitosterol can promote osteogenic differentiation of BMSCs by activating the TGF - β 1/Smad3 pathway.

Key words: β - sitosterol; transforming growth factor β 1/mothers against decapentaplegic drosophila homolog 3; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

刺激骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)自我更新及成骨分化可对骨再生发挥有益作用^[1]。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF - β 1)/果蝇母体 DPP 同源物 3 (drosophila mothers against DPP homolog 3, Smad3) 是调控成骨分化的重要信号通路, 其通路表达下调与骨质疏松关系密切^[2], 激活该信号通路可促进人 BMSCs 成骨分化^[3]。 β - 谷甾醇是一种植物甾醇, 可促进成骨细胞分化, 对骨质疏松症发挥治疗作用^[4-5], 有研究表明, β - 谷甾醇可以激活 TGF - β 1/Smad3 信号通路^[6], 由此推测 β - 谷甾醇可能通过激活 TGF - β 1/

Smad3 信号通路促进 BMSCs 成骨分化。本文探讨 β - 谷甾醇对 BMSCs 成骨分化的促进作用, 为 β - 谷甾醇应用于骨修复提供理论基础。

材料与方法

1 材料

细胞 人 BMSCs, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

药品与试剂 β - 谷甾醇, 规格: 25 mg, 纯度: $\geq 95\%$, 批号: S1270, 购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司; Smad3 抑制剂 (smad3 inhibitor, SIS3), 规

格:25 mg,纯度:98.71%,批号:HY-13013,购自美国 MedChemExpress 公司;细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒、茜素红 S 钠盐染料,均购自美国 MedChemExpress 公司;人碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒,购自武汉吉立德生物科技有限公司;HRP-驴抗兔二抗、兔源抗人 Anti-骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、骨钙素 (Osteocalcin, OCN)、Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2)、成骨细胞特异性转录因子 (Osterix, Osx)、Smad3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 与 p-Smad3 一抗,均购自美国 Abcam 公司;BMSCs 完全培养基及其成骨诱导分化培养基,均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

仪器 C-1150 酶标仪,德国 Leica 公司产品;GX53 光学显微镜,日本 Olympus 株式会社产品;SE400 垂直电泳系统、TE62 转印系统,美国 Amersham 公司产品等。

2 实验方法

2.1 细胞培养

采用 BMSCs 完全培养基进行常规培养,进行成骨诱导分化时换用成骨诱导分化培养基,置于含 5% CO_2 、湿度 95% 及 37 °C 恒温细胞培养箱中培养。

2.2 β -谷甾醇合适作用浓度筛选^[3]

BMSCs 快速解冻复苏后传代培养,取第 3 代细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种在 96 孔板培养 24 h,采用 0.00、1.50、3.00、6.00、9.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预 24 h^[5],同时设不接种细胞的空白对照,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 1.5 h,采用酶标仪测定 450 nm 处各 β -谷甾醇干预组细胞吸光度,测定其细胞活力。

细胞活力 (%) = (β -谷甾醇干预组吸光度 - 对照组吸光度) / (0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预组吸光度 - 对照组吸光度) $\times 100\%$ 。

取第 3 代 BMSCs 以每孔 1×10^5 个的密度接种在 24 孔板培养 24 h,用 0.00、1.50、3.00、6.00、9.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预 24 h,用 BMSCs 成骨诱导分化培养基诱导成骨分化 14 d,分组收集 BMSCs 于 RIPA 内裂解,离心取上清,参照 ALP ELISA 试剂盒说明书在酶标包被板中进行加样、加酶温育 (37 °C、60 min)、洗涤、显色、终止反应等一系列操作后,用酶标

仪测定各组 BMSCs 吸光度后分析计算其 ALP 活性。

2.3 细胞分组与干预方法^[3]

取第 3 代的 BMSCs,以每孔 1×10^5 个的密度接种在 24 孔板培养 24 h,随机分为对照组、 β -谷甾醇低剂量组、 β -谷甾醇中剂量组和 β -谷甾醇高剂量组,对照组细胞正常培养不进行药物干预, β -谷甾醇低剂量组、 β -谷甾醇中剂量组和 β -谷甾醇高剂量组细胞分别用 1.50、3.00、6.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇进行干预,干预 24 h 后对各组 BMSCs 进行成骨分化及蛋白检测。

2.4 用 ELISA、茜素红染色分别检测各组 BMSCs ALP 与钙沉积率^[3]

ALP 活性测定 按“2.2”中方法测定分组干预后的各组 BMSCs 的 ALP 活性。

茜素红染色 诱导分组干预后的各组 BMSCs 成骨分化 14 d,固定后镜下拍照,然后行茜素红染色,洗涤后镜下拍摄,然后加入 10% 西吡氯铵将与钙结合的茜素红充分溶解,用酶标仪测定 560 nm 处各组光密度,计算钙沉积率。

钙沉积率 (%) = 药物干预组吸光度 / 对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

2.5 用蛋白质印迹法检测成骨分化与 TGF- β 1/Smad3 通路相关蛋白表达^[3]

分组收集分组干预后的各组 BMSCs,于 RIPA 内裂解,离心取上清,其中总蛋白以 BCA 法测定浓度后进行煮沸变性,以每孔 30.00 μg 上样进行电泳分离,全湿电转后进行封闭,4 °C 下分别孵育 Anti-BMP-2、OCN、Runx2、Osx、Smad3、TGF- β 1、p-Smad3 与 GAPDH 一抗过夜,洗涤后 37 °C 下孵育二抗 2 h,再次洗涤后对蛋白条带进行显色,拍照后定量其灰度,用 GAPDH 做内参对照归一化蛋白相对表达。

2.6 探究抑制 TGF- β 1/Smad3 通路激活对 β -谷甾醇调控 BMSCs 成骨分化的作用的影响

取第 3 代 BMSCs 以每孔 1×10^5 个的密度接种在 24 孔板培养 24 h,随机分为 4 组,正常培养不进行药物干预的细胞设为对照组,用 6.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预的细胞设为 β -谷甾醇组,用 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SIS3 (TGF- β 1/Smad3 通路抑制剂) 干预的细胞设为 SIS3 组^[7],用 6.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇和 5.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SIS3 联合干预的细胞设为 β -谷甾醇 + SIS3 组,干预 24 h 后以同法对各组 BMSCs 进行成骨分化及蛋白检测^[3]。

3 统计学处理

用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,实验

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间多重比较进行单因素方差分析,事后两两比较行 SNK- q 检验。

结 果

1 β -谷甾醇合适作用浓度筛选结果

0.00、1.50、3.00、6.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预时 BMSCs 细胞活力分别为 $(100.00 \pm 0)\%$ 、 $(99.61 \pm 12.54)\%$ 、 $(105.12 \pm 18.76)\%$ 和 $(110.43 \pm 24.31)\%$, β -谷甾醇浓度 $\leq 6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 BMSCs 细胞活力几乎无影响(均 $P > 0.05$)。0.00、1.50、3.00、6.00、9.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预时 BMSCs ALP 活性分别为 (0.91 ± 0.11) 、 (1.28 ± 0.10) 、 (1.59 ± 0.12) 、 (1.95 ± 0.14) 和 $(2.23 \pm 0.09) \text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$, 1.50、3.00、6.00、9.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇均可显著提高 BMSCs ALP 活性($P < 0.05$),因而本文为了排除细胞增殖对实验结果的影响,选择 1.50、3.00、6.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇干预 BMSCs 进行后续实验。

表1 各组骨髓间充质干细胞(BMSCs)碱性磷酸酶(ALP)活性与钙沉积率($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Alkaline phosphatase(ALP) activity and calcium deposition rate of bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	ALP activity ($\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	Calcium deposition rate (%)
Control group	6	0.95 ± 0.09	100.00 ± 0
β -sitosterol-L group	6	$1.24 \pm 0.10^*$	$196.21 \pm 13.67^*$
β -sitosterol-M group	6	$1.53 \pm 0.08^{* \#}$	$301.73 \pm 16.90^{* \#}$
β -sitosterol-H group	6	$1.84 \pm 0.11^{* \# \Delta}$	$423.60 \pm 20.25^{* \# \Delta}$

Control group: Did not receive any drug intervention; β -sitosterol-L group, β -sitosterol-M group, β -sitosterol-H group: Treated with 1.5, 3.0, and 6.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of β -sitosterol for 24 h, respectively. Compared with control group, $^* P < 0.05$; Compared with β -sitosterol-L group, $^{\#} P < 0.05$; Compared with β -sitosterol-M group, $^{\Delta} P < 0.05$.

表2 各组 BMSCs 成骨分化相关蛋白相对表达($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative expression levels of osteogenic differentiation related proteins of BMSCs in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	BMP-2	Runx2	OCN	Osx
Control group	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.20 ± 0.05
β -sitosterol-L group	$0.49 \pm 0.05^*$	$0.57 \pm 0.06^*$	$0.47 \pm 0.04^*$	$0.59 \pm 0.07^*$
β -sitosterol-M group	$0.89 \pm 0.07^{* \#}$	$0.98 \pm 0.08^{* \#}$	$0.86 \pm 0.06^{* \#}$	$1.01 \pm 0.10^{* \#}$
β -sitosterol-H group	$1.30 \pm 0.09^{* \# \Delta}$	$1.39 \pm 0.10^{* \# \Delta}$	$1.25 \pm 0.08^{* \# \Delta}$	$1.42 \pm 0.12^{* \# \Delta}$

Dose and n refer to Table 1. BMSCs: Bone marrow mesenchymal stem cells; BMP-2: Bone morphogenetic protein 2; Runx2: Runt-related transcription factor 2; OCN: Osteocalcin; Osx: Osterix. Compared with control group, $^* P < 0.05$; Compared with β -sitosterol-L group, $^{\#} P < 0.05$; Compared with β -sitosterol-M group, $^{\Delta} P < 0.05$.

2 β -谷甾醇对 BMSCs 成骨分化的影响

与对照组比较, β -谷甾醇低、中、高剂量实验组 ALP 活性与钙沉积率均显著升高,并呈剂量依赖性($P < 0.05$),见表1。

3 β -谷甾醇对 BMSCs 成骨分化相关蛋白表达的影响

与对照组比较, β -谷甾醇低、中、高剂量组 BMP-2、Runx2、OCN、Osx 蛋白相对表达水平均显著升高,并呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$),见表2和图1。

4 β -谷甾醇对 BMSCs TGF- $\beta 1$ /Smad3 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, β -谷甾醇低、中、高剂量实验组 TGF- $\beta 1$ 蛋白和 p-Smad3/Smad3 相对表达水平均显著升高,并呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$),见表3。

5 SIS3 对 β -谷甾醇的 BMSCs 成骨分化促进作用的影响

与对照组比较, β -谷甾醇组 ALP 活性与钙沉积率显著升高(均 $P < 0.05$),SIS3 组 ALP 活性与钙沉积

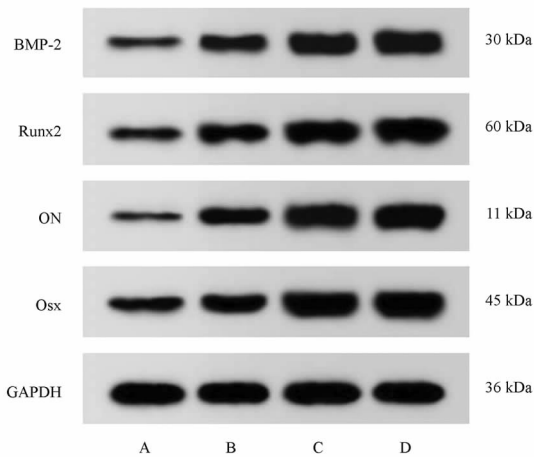


图1 蛋白质印迹法检测各组 BMSCs 成骨分化相关蛋白表达

Figure 1 The expression of osteogenic differentiation related proteins of BMSCs in each group detected by Western blot

A: Control group; B: β -sitosterol-L group; C: β -sitosterol-M group; D: β -sitosterol-H group.

率均显著降低(均 $P < 0.05$);与 β -谷甾醇组比较, β -谷甾醇+ SIS3 组 ALP 活性与钙沉积率显著降低(均 $P < 0.05$),见表4。

6 SIS3 对 β -谷甾醇的 TGF- β 1/Smad3 通路及成骨分化相关蛋白表达调控作用的影响

与对照组比较, β -谷甾醇组 BMP-2、Runx2、

表 3 各组 BMSCs 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)/果蝇母体抗
脑脊髓瘫痪同源物 3 (Smad3) 通路相关蛋白相对表达($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Relative expression of TGF- β 1/Smad3 pathway related
proteins of BMSCs in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	TGF- β 1	p-Smad3/Smad3
Control	0.10 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02
β -sitosterol-L	0.47 $\pm$ 0.04 *	0.32 $\pm$ 0.03 *
β -sitosterol-M	0.85 $\pm$ 0.07 ** [#]	0.59 $\pm$ 0.06 ** [#]
β -sitosterol-H	1.26 $\pm$ 0.09 ** [#] Δ	0.94 $\pm$ 0.05 ** [#] Δ

Dose and n refer to Table 1. Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with β -sitosterol-L group, [#] $P < 0.05$; Compared with β -sitosterol-M group, Δ $P < 0.05$.

表 4 各组 BMSCs ALP 活性与钙沉积率($\bar{x} \pm s$)

Table 4 ALP activity and calcium deposition rate of BMSCs in
each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ALP activity (U $\cdot$ mg prot ⁻¹)	Calcium deposition rate(%)
Control	6	0.91 $\pm$ 0.10	100.00 $\pm$ 0
β -sitosterol	6	1.78 $\pm$ 0.14 *	410.35 $\pm$ 19.72 *
SIS3	6	0.43 $\pm$ 0.08 *	45.62 $\pm$ 13.91 *
β -sitosterol + SIS3	6	0.97 $\pm$ 0.13 [#]	109.14 $\pm$ 16.53 [#]

SIS3: Smad 3 inhibitor; Control group: Did not receive any drug intervention; β -sitosterol group: Treated with 6 μ g $\cdot$ mL⁻¹ β -sitosterol for 24 h; SIS3 group: Treated with 5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ SIS3 for 24 h; β -sitosterol + SIS3 group: Treated with a combination of 6 μ g $\cdot$ mL⁻¹ β -sitosterol and 5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ SIS3 for 24 h. Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with β -sitosterol group, [#] $P < 0.05$.

表 5 各组 BMSCs 成骨分化与 TGF- β 1/Smad3 通路相关蛋白相对表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Relative expression of osteogenic differentiation and TGF- β 1/Smad3 pathway related proteins of BMSCs in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	BMP-2	Runx2	OCN	Osx	TGF- β 1	p-Smad3/Smad3
Control	0.85 $\pm$ 0.11	0.76 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.11	0.55 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.04
β -sitosterol	1.79 $\pm$ 0.16 *	1.68 $\pm$ 0.14 *	1.61 $\pm$ 0.13 *	1.76 $\pm$ 0.14 *	1.47 $\pm$ 0.10 *	0.94 $\pm$ 0.06 *
SIS3	0.27 $\pm$ 0.07 *	0.22 $\pm$ 0.06 *	0.17 $\pm$ 0.05 *	0.26 $\pm$ 0.07 *	0.11 $\pm$ 0.03 *	0.09 $\pm$ 0.02 *
β -sitosterol + SIS3	0.87 $\pm$ 0.10 [#]	0.78 $\pm$ 0.10 [#]	0.71 $\pm$ 0.09 [#]	0.83 $\pm$ 0.12 [#]	0.56 $\pm$ 0.09 [#]	0.45 $\pm$ 0.05 [#]

Dose and n refer to Table 4. BMSCs: Bone marrow mesenchymal stem cells; BMP-2: Bone morphogenetic protein 2; Runx2: Runt-related transcription factor 2; OCN: Osteocalcin; Osx: Osterix; Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with β -sitosterol group, [#] $P < 0.05$. TGF- β 1: Transforming growth factor β 1.

OCN、Osx、TGF- β 1 蛋白表达与 p-Smad3/Smad3 均显著升高(均 $P < 0.05$), SIS3 组 BMP-2、Runx2、OCN、Osx、TGF- β 1 蛋白表达与 p-Smad3/Smad3 均显著降低(均 $P < 0.05$);与 β -谷甾醇组比较, β -谷甾醇+ SIS3 组 BMP-2、Runx2、OCN、Osx、TGF- β 1 蛋白表达与 p-Smad3/Smad3 均显著降低(均 $P < 0.05$),见表5和图2。

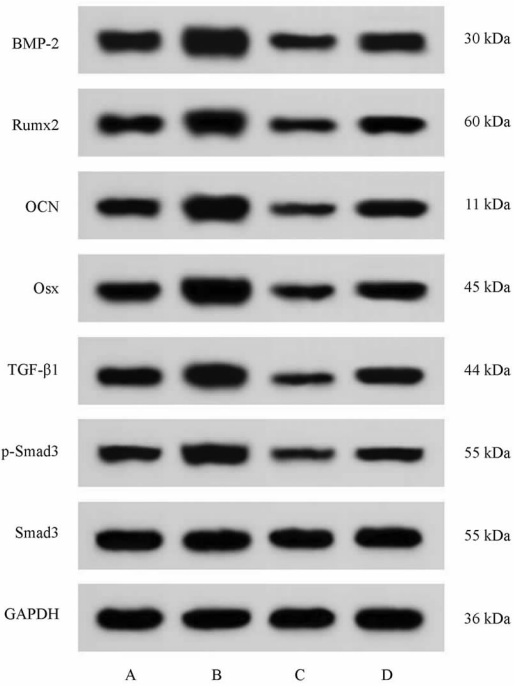


图 2 蛋白质印迹法检测各组 BMSCs 成骨分化与 TGF- β 1/Smad3 通路相关蛋白表达

Figure 2 Western blot was used to detect the expression of osteogenic differentiation and TGF- β 1/Smad3 pathway related proteins of BMSCs in each group

A: Control group; B: β -sitosterol group; C: SIS3 group; D: β -sitosterol + SIS3 group.

讨 论

广泛分布于骨髓组织中的 BMSCs 具有多向分化潜能,在骨骼疾病的治疗中发挥关键作用,因而探寻增强 BMSCs 成骨分化的有效方法具有重大临床价值^[8-10]。 β -谷甾醇可影响骨骼形态与功能,能通过减少破骨细胞形成而抑制去卵巢小鼠骨丢失^[11],作为细辛-白芷药对的活性成分,能有效促进成骨细胞分化^[12],还可促进体内骨形成^[13],且 β -谷甾醇作为更为安全的一种天然植物甾醇,具有多靶点调控骨代谢、高安全性及天然来源等优势,适合骨骼疾病的长期管理。因此,本文选择 β -谷甾醇,探究其对 BMSCs 成骨分化作用的研究,结果显示, β -谷甾醇干预后 BMSCs 钙沉积率与 ALP 活性明显升高,且免疫印记实验结果显示 β -谷甾醇干预后 BMSCs 的成骨分化相关蛋白 BMP-2、Runx2、OCN、Ox₆ 表达明显升高,均呈剂量依赖性,与前人研究相比,本研究首次证实了 β -谷甾醇可呈剂量依赖性的促进 BMSCs 成骨分化。

TGF- β 1/Smad3 是调控细胞成骨分化的重要信号通路^[14-16],可以触发包括 BMSCs 在内的间充质干细胞成骨分化,增强骨形成,进而对胫骨缺损、骨质疏松症发挥潜在的治疗作用^[3,17]。本文结果显示, β -谷甾醇可呈剂量依赖性的升高 BMSCs TGF- β 1 蛋白表达与 Smad3 磷酸化,与前人研究相比,本研究首次证实了 TGF- β 1/Smad3 信号通路可被 β -谷甾醇激活,并可以介导 β -谷甾醇对 BMSCs 成骨分化的促进作用。以 β -谷甾醇与 TGF- β 1/Smad3 通路抑制剂 SIS3 联合干预 BMSCs,可减弱 β -谷甾醇单独干预对 BMSCs 成骨分化相关蛋白表达的上调作用,消除其对 BMSCs 成骨分化的促进作用。前人研究表明, β -谷甾醇可与丝裂原活化蛋白激酶 1、蛋白激酶 B1 等关键靶点结合,通过调节免疫炎症反应成骨细胞分化更缓解骨质疏松症^[4],且 β -谷甾醇作为辣木叶提取物的活性成分之一,可通过增强 BMP-2 和 Runx2 基因表达而促进原代成骨细胞成骨分化^[18],由此可知, β -谷甾醇介导成骨分化是通过多靶点、多信号进行的,而本研究明确了 β -谷甾醇促进 BMSCs 成骨分化是通过激活 TGF- β 1/Smad3 信号通路实现的,是通过直接作用还是通过调控其它信号的间接作用,本研究尚未进行探讨,存在一定局限性,后续还需通过网络药理学和分子对接实验进行深入探讨。

总而言之, β -谷甾醇可呈剂量依赖性的上调成骨分化相关蛋白表达,进而增强 BMSCs 成骨分化能力,激活 TGF- β 1/Smad3 通路可能是其发挥成骨促进作用的药理机制,本文证实了 β -谷甾醇具有促进骨形成再生的潜力,为其应用于骨修复、抗骨质疏松等领域提供了新的理论依据。本研究关于 β -谷甾醇具体药理机制的研究并不全面,且还未涉及体内动物实验,存在一定不足和局限性,后续需进行体内实验、网络药理学研究等来完善不足之处。

参考文献:

- [1] MAHAJAN A, BHATTACHARYA S. Immunomodulation by mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation: Clinical implications during bone regeneration [J/OL]. *Mol Immunol*, 2023,164:143—152. 2023-11-26 [2025-06-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38011783/>.
- [2] MA Z, QIU L, LI J, et al. Construction a novel osteoporosis model in immune-deficient mice with natural ageing [J/OL]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024,735:150820—150827. 2024-10-11 [2025-06-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39406026/>.
- [3] HUANG Y, LIAO L, SU H, et al. Psoralen accelerates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by activating the TGF- β /Smad3 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(3):940—948.
- [4] WANG J, HUANG Y, GUO L, et al. Molecular mechanism of *Achyranthis bidentatae* radix and *Morindae officinalis* radix in osteoporosis therapy: An investigation based on network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulations [J/OL]. *Biochem Biophys Res*, 2023, 36: 101586—101606. 2023-11-16 [2025-06-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38076660/>.
- [5] NGUYEN H T T, NGO Q V, LE D T T, et al. β -sitosterol from *Clinacanthus nutans* Lindau enhances osteoblastogenic activity via upregulation of differentiation related genes and proteins [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2022,86(12):1615—1622.
- [6] MAZUMDAR S, GHOSH A K, DINDA M, et al. Evaluation of wound healing activity of ethanol extract of *Annona reticulata* L. leaf both *in vitro* and in diabetic mice model [J]. *J Tradit Complement Med*, 2019,11(1):27—37.
- [7] RU Y, GU H, SUN L, et al. Mechanical stretch-induced ATP release from osteocytes promotes osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Discov Med*, 2024, 36(182): 494—508.
- [8] 汪可欣,白敏,宋冰,等. β -蜕皮甾醇调控 BMSCs 自噬促进成骨分化的作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2025,41(4): 527—532.
- [9] JASIM OTHMAN R, FAWZI CHAWSHLI O. Effect of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on the rate of orthodontic tooth movements in rabbits [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le*

- grand), 2024, 70(6):217—223.
- [10] SU Z, CHEN D, HUANG J, *et al.* Isoliquiritin treatment of osteoporosis by promoting osteogenic differentiation and autophagy of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(1):214—230.
- [11] 郭惠智. 基于网络药理学探讨 β -谷甾醇抑制破骨细胞和减少去卵巢小鼠骨丢失的作用机制[D]. 广东 广州:广州中医药大学, 2022.
- [12] CHEN Q, WANG Y, SHI C, *et al.* Molecular mechanism of the asarum-angelica drug pair in the treatment of periodontitis based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24):17389—17406.
- [13] 姜耘宙, 汪正明, 王瑞, 等. β -谷甾醇改善绝经后骨质疏松的实验研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2024, 48(2):131—137, 146.
- [14] LU X, LI W, WANG H, *et al.* The role of the Smad2/3/4 signaling pathway in osteogenic differentiation regulation by CIC-3 chloride channels in MC3T3-E1 cells [J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1):338—347.
- [15] CHEN J, YANG X, HUANG Y, *et al.* Knockdown of SIGLEC1 inhibits osteogenic differentiation to alleviate ankylosing spondylitis progression by suppressing the TGF- β 1/SMAD signaling pathway [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 398(3):2933—2944.
- [16] WANG K, JIAN M, CHEN Y, *et al.* Soy peptide ameliorate TGF- β 1-mediated osteoblast differentiation through smad and MAPK signaling pathways [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(42):23246—23257.
- [17] FAQEER A, WANG M, ALAM G, *et al.* Cleaved SPPI-rich extracellular vesicles from osteoclasts promote bone regeneration via TGF β 1/SMAD3 signaling [J/OL]. *Biomaterials*, 2023, 303:122367—122383. 2023-10-21 [2025-06-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38465579/>.
- [18] KHAN M I, SIDDIQUI S, BARKAT M A, *et al.* Moringa oleifera leaf extract induces osteogenic-like differentiation of human osteosarcoma SaOS2 cells [J]. *J Tradit Complement Med*, 2022, 12(6):608—618.

(收稿日期 2025-07-15)

· 科学文摘 ·

Vutrisiran 在转甲状腺素蛋白淀粉样变性心肌病患者中的应用

引自: FONTANA M, BERK JL, GILLMORE JD, *et al.* Vutrisiran in patients with transthyretin amyloidosis with cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 2025, 392(1):33—44.

转甲状腺素蛋白淀粉样变性心肌病(transthyretin amyloidosis with cardiomyopathy, ATTR-CM)是一种进行性、致命性疾病。Vutrisiran 是一种皮下给药的 RNA 干扰治疗药物,可抑制肝脏转甲状腺素蛋白的产生。在这项双盲、随机试验中,研究者将 ATTR-CM 患者按 1:1 的比例分配接受 vutrisiran(25 mg)或安慰剂治疗,每 12 周一次,持续长达 36 个月。主要复合终点是全因死亡和复发性心血管事件。次要终点包括全因死亡率、6 分钟步行测试距离较基线的变化,以及堪萨斯城心肌病问卷总体评分(Kansas city cardiomyopathy questionnaire-overall summary, KCCQ-OS)较基线的变化。在总体人群和单药治疗人群(基线时未接受他法米地治疗的患者)中评估疗效终点,并进行分层检验。

共有 655 名患者接受随机分组;326 名被分配接受 vutrisiran 治疗,329 名接受安慰剂治疗。与安慰剂相比, Vutrisiran 治疗导致全因死亡和复发性心血管事件的风险更低[总体人群中的风险比为 0.72;95% 置信区(confidence interval, CI)为 0.56 至 0.93; $P=0.01$; 单药治疗人群中的风险比为 0.67;95% CI 为 0.49 至 0.93; $P=0.02$],并且在 42 个月内全因死亡风险也更低(总体人群中的风险比为 0.65;95% CI 为 0.46 至 0.90; $P=0.01$)。在总体人群中, vutrisiran 组有 125 名患者,安慰剂组有 159 名患者至少发生了一次主要终点事件。在总体人群中,与安慰剂相比, vutrisiran 治疗导致 6 分钟步行测试距离的下降幅度更小(最小二乘均值差为 26.5 米;95% CI 为 13.4 至 39.6; $P<0.001$),并且 KCCQ-OS 评分的下降幅度也更小(最小二乘均值差为 5.8 分;95% CI 为 2.4 至 9.2; $P<0.001$)。在单药治疗人群中观察到类似的益处。两组的不良事件发生率相似(vutrisiran 组为 99%,安慰剂组为 98%); vutrisiran 组中有 62% 的患者发生严重不良事件,安慰剂组中这一比例为 67%。在 ATTR-CM 患者中,与安慰剂相比, vutrisiran 治疗可降低全因死亡和心血管事件的风险,并能维持功能状态和生活质量。