

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research β -蜕皮甾酮调控 BMSCs 自噬促进成骨分化的作用Effects of β -ecdysterone in regulating BMSCs autophagy and promoting osteogenic differentiation汪可欣^{1a}, 白敏^{1b}, 宋冰^{1a,2},
郭超^{1a,2}, 张延英^{1b,2}, 邢尚曼^{1a},
宋文静^{1a}, 曹婷婷^{1a}, 汪永锋^{1a,2,3}

(1. 甘肃中医药大学, a. 第一临床医学院; b. 基础医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省实验动物行业技术中心, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃医学院 基础医学院, 甘肃 平凉 744000)

WANG Ke-xin^{1a}, BAI Min^{1b},
SONG Bing^{1a,2}, GOU Chao^{1a,2},
ZHANG Yan-ying^{1b,2},
XING Shang-man^{1a},
SONG Wen-jing^{1a},
CAO Ting-ting^{1a},
WANG Yong-feng^{1a,2,3}

(1. a. First Clinical Medical College; b. Basic Medicine College, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; 2. Gansu Provincial Laboratory Animal Industry Technology Center, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; 3. School of Basic Medicine, Gansu Medical College, Pingliang 744000, Gansu Province, China)

基金项目: 甘肃省科技重点研发计划基金资助项目(23YFFA0068); 甘肃省教育厅高等学校科研基金资助项目(2023A-080); 甘肃中医药大学成果转化培育基金资助项目(2023CGZH-21); 甘肃中医药大学创新创业基金项目; 甘肃省中医药管理局基金资助项目(GZKP-2023-19)**作者简介:** 汪可欣(2000—), 女, 硕士研究生, 主要从事中医药防治骨质疏松相关研究**通信作者:** 汪永锋, 教授, 硕士生导师

MP: 13519692259

E-mail: wyf@gszy.edu.cn

摘要:目的 基于5'-腺嘌呤核苷酸依赖的蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路调控自噬探讨 β -蜕皮甾酮对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的干预作用及机制。方法 将BMSCs细胞分为对照组(正常培养)和低、中、高剂量组(用0.01、0.10和1.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 β -蜕皮甾酮进行干预)。用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法测定细胞基因的表达,用免疫荧光(IF)法测定细胞蛋白相对表达水平。结果 对照组和低、中、高剂量组的碱性磷酸酶(ALP) mRNA 相对表达水平分别为 1.01 ± 0.14 、 1.22 ± 0.05 、 1.28 ± 0.05 和 1.59 ± 0.20 , Runt 相关转录因子2(RUNX2) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.07 、 1.45 ± 0.07 、 2.11 ± 0.32 和 4.67 ± 1.45 , 磷酸化 AMPK 蛋白相对表达水平分别为 0.07 ± 0.01 、 0.11 ± 0.01 、 0.06 ± 0.01 和 0.18 ± 0.01 , 选择性自噬接头蛋白(p62/SQSTM1)相对表达水平分别为 1.72 ± 0.02 、 1.67 ± 0.02 、 0.94 ± 0.01 和 0.04 ± 0.01 , p-mTOR 蛋白相对表达水平分别为 0.66 ± 0.01 、 0.40 ± 0.01 、 0.42 ± 0.01 和 0.04 ± 0.01 , 微管相关蛋白轻链3(LC3B)蛋白相对表达水平分别为 0.07 ± 0.01 、 0.20 ± 0.01 、 0.87 ± 0.05 和 1.27 ± 0.04 。低、中、高剂量组的上述指标与对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.001$)。结论 β -蜕皮甾酮能够通过激活 AMPK/mTOR 通路调控 BMSCs 自噬促进其成骨分化。

关键词: β -蜕皮甾酮; 5'-腺嘌呤核苷酸依赖的蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白通路; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 自噬

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.04.016**中图分类号:** R28 **文献标志码:** A**文章编号:** 1001-6821(2025)04-0527-06

Abstract: Objective To investigate the intervention effect and mechanism of β -ecdysterone on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) based on the regulation of autophagy by the adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR). **Methods** BMSCs cells were divided into control group (normal culture), low-, middle- and high-dose groups (intervened with 0.01, 0.10 and 1.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ecdysterone). The expression of cell genes was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR); and the relative expression level of cell proteins was determined by immunofluorescence (IF). **Results** The relative expression levels of alkaline phosphatase (ALP) mRNA in the control group, low-, middle and high-dose groups were 1.01 ± 0.14 , 1.22 ± 0.05 , 1.28 ± 0.05 ,

1.59 ± 0.20; the relative protein expression levels of Runt - related transcription factor 2 (RUNX2) mRNA were 1.00 ± 0.07, 1.45 ± 0.07, 2.11 ± 0.32, 4.67 ± 1.45; the relative protein expression levels of phosphorylated AMPK protein were 0.07 ± 0.01, 0.11 ± 0.01, 0.06 ± 0.01, 0.18 ± 0.01; and the relative protein expression levels of Sequestosome 1 (p62/SQSTM1) protein were 1.72 ± 0.02, 1.67 ± 0.02, 0.94 ± 0.01, 0.04 ± 0.01; the relative protein expression levels of p - mTOR protein were 0.66 ± 0.01, 0.40 ± 0.01, 0.42 ± 0.01, 0.04 ± 0.01; and the relative protein expression levels of microtubule - associated protein 1 light chain 3 beta (LC3B) protein were 0.07 ± 0.01, 0.20 ± 0.01, 0.87 ± 0.05, 1.27 ± 0.04, respectively. There were statistically significant differences between the low -, middle -, and high - dose groups and the control group ($P < 0.05$, $P < 0.001$). **Conclusion** β - ecdyssterone can regulate autophagy and promote osteogenic differentiation of BMSCs by activating the AMPK/mTOR pathway.

Key words: β - ecdyssterone; adenosine 5' - monophosphate kinase - activated protein / mammalian target of rapamycin pathway; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; autophagy

骨质疏松症(osteoporosis, OP)与包括更年期和衰老在内的各种因素有关,是最常见的慢性代谢性骨病^[1]。骨吸收和骨形成的不平衡是造成OP的重要原因,而BMSCs在维持这一平衡中发挥着重要作用。研究发现, β - 蜕皮甾酮可以以剂量依赖性的方式逆转地塞米松抑制的骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖及成骨分化,其具体机制与 β - 蜕皮甾酮调控了BMSCs增殖、凋亡和自噬有关^[2-3]。自噬可促进间充质干细胞向成骨细胞分化、提升成骨细胞的矿化能力、增强骨细胞的活性延长骨细胞的寿命^[4]。研究发现,激活5' - 腺嘌呤核苷酸依赖的蛋白激酶(adenosine 5' - monophosphate kinase - activated protein, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路可以提高骨相关细胞自噬,改善骨微结构^[5]。本研究旨在探究 β - 蜕皮甾酮对BMSCs细胞增殖和成骨分化的干预作用。

材料与方法

1 材料

动物 雌性SD大鼠,鼠龄12周,体质量180 ~ 220 g,由甘肃中医药大学实验动物中心提供。动物生产许可证号:SCXK(甘)2021 - 0004。本实验经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:2023 - 745)。

药物与试剂 β - 蜕皮甾酮,规格:每支10 mg,批号:105314,美国MCE公司生产。CD90抗体、CD29抗体,均为美国BioLegend公司生产;CD45抗体,杭州联科生物技术有限公司生产;细胞计数试剂盒8(cell counting kit - 8, CCK - 8),上海翌圣生物科技股份有

限公司生产;成骨诱导培养液,武汉普诺赛生命科技有限公司生产;4%组织细胞固定液,北京索莱宝科技有限公司生产;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)显色试剂盒、茜素红(alizarin red S, ARS)染色液,均由碧云天公司生物技术有限公司生产;微管相关蛋白轻链3(microtubule - associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B)、磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p - AMPK)、磷酸化mTOR(phosphorylated mTOR, p - mTOR)抗体,江苏亲科生物研究中心有限公司生产;选择性自噬接头蛋白(sequestosome 1, p62/SQSTM1)抗体,美国GeneTex公司生产;引物,上海百赛生物技术股份有限公司设计合成。

仪器 FACS Celesta 高端分析型流式细胞仪,美国Becton Dickinson公司产品; iMark 酶标仪,美国Bio - Rad公司产品; ICX41 显微镜,宁波舜宇光学科技有限公司产品; FV1000 激光扫描共聚焦显微镜,日本Olympus公司产品; CG - 05 - 1492 实时荧光定量聚合酶链反应(real - time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, PCR)仪,杭州晶格科学仪器有限公司产品。

2 实验方法

2.1 BMSCs的分离培养与鉴定

取SD大鼠处死后,75%乙醇浸泡,分离双侧股骨,纱布擦去多余组织,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)充分洗涤,剪去股骨两端后,用无血清 α MEM冲洗骨髓腔,转移至含细胞的 α MEM至15 mL离心管,以1 000 r · min⁻¹离心5 min,弃上清液,用含有10%胎牛血清和1%双抗的 α - MEM培养基4 mL重悬沉淀,接种在培养皿内培养,2 d更换1次培养基,当细胞汇合至80%后用0.25%胰蛋白酶进行消化传代,取第3代细胞鉴定为BMSCs后开展后续实验。

胰酶消化 BMSCs,终止消化后 $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液,用 PBS 洗涤后重悬,加入 CD45、CD44 或 CD90 $5\text{ }\mu\text{L}$ 在黑暗中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,孵育结束后用流式细胞仪评估平均荧光强度。

2.2 药物制备

将 β -蜕皮甾酮 4.8 mg 常温下溶于二甲基亚砜 1 mL 中,反复吹打至完全溶解,得到 $1\times 10^4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -蜕皮甾酮,存放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。实验时取 $1\times 10^4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 β -蜕皮甾酮溶液稀释得出终浓度为 0.01 、 0.10 、 1.00 和 $10.00\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的含 β -蜕皮甾酮培养基。

2.3 CCK-8 筛选药物浓度

将 BMSCs 细胞接种于 96 孔板中(2×10^4 个细胞每孔),待细胞贴壁后,用含不同浓度 β -蜕皮甾酮(0 、 0.01 、 0.10 、 1.00 和 $10.00\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的完全培养基分别干预 3、5 和 7 d,干预结束后每孔加入 CCK-8 溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1.5 h,用酶标仪在 450 nm 测定各孔的光密度(optical density, OD)值。

2.4 细胞分组与给药方法

细胞分为对照组和低、中、高剂量组。对照组使用成骨诱导液诱导细胞和低、中、高剂量组分别在对照组的基础上用 0.01 、 0.10 和 $1.00\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -蜕皮甾酮进行干预。

2.5 ALP 染色检测细胞碱性磷酸酶水平

分别将 BMSC 细胞以每孔 1×10^6 个接种至 12 孔板中,细胞生长至 80% 后,按照细胞分组用含不同浓度 β -蜕皮甾酮的成骨诱导培养液诱导 14 d,诱导结束后弃去旧培养基,按照碱性磷酸酶显色试剂盒说明书进行操作,在倒置显微镜下观察拍照。

2.6 ARS 染色检测细胞钙盐沉积水平

取 BMSCs 细胞以每孔 2×10^6 个接种于 6 孔板中,按“2.4”实验分组给予相应药物连续干预 21 d 后,根据茜素红 S 染色液说明书进行操作,在倒置显微镜下观察拍照。

2.7 qRT-PCR 检测各组细胞中 ALP、Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 和 Sp7 转录因子 (Sp7 transcription factor, Sp7) mRNA 相对表达水平

将 BMSCs 细胞接种至培养瓶中,待细胞生长至 80% 后,根据上述实验分组连续干预 14 d。用总 RNA 提取试剂 (Trizol) 提取各组细胞 RNA,用分光光度计进行浓度测定后,按照反转录试剂盒说明书配制逆转录反应体系,总反应体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$,反转录成 cDNA;按照扩增试剂盒说明书进行 PCR 扩

增,反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 10\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 10\text{ s}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$, 40 个循环。以 β -actin 作为内对照,用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各组细胞中 ALP、Runx2 和 SP7 mRNA 的相对表达水平。

2.8 免疫荧光法分别检测各组细胞中 p-AMPK、p-mTOR、LC3B、p62 蛋白相对表达水平

将细胞以每孔 1×10^5 个均匀铺在 12 孔板内,按分组干预后, PBS 洗涤 3 遍, 4% 组织细胞固定液固定 15 min, 通透 20 min, 封闭 30 min, 与一抗孵育过夜, 二抗避光孵育 1 h 后清洗, 滴加 4', 6-联脒-2'-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2'-phenylindole, DAPI) 孵育, 封片, 在共聚焦显微镜下拍照并分析目的蛋白表达情况, 用 Image J 分析各组目的蛋白与 DAPI 荧光强度的比值。

3 统计学处理

用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。计量资料呈正态分布, 用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 方差齐性的两两比较用 LSD- t 法, 方差不齐的两两比较用 Tamhane's T2 法。

结 果

1 BMSCs 细胞及成骨分化能力的鉴定

1.1 BMSCs 表面标志物的鉴定

流式细胞术分析鉴定 BMSCs 细胞表面标志物: CD29 和 CD90 的表达呈阳性, 平均荧光强度分别为 $(98.66\pm 2.11)\%$ 和 $(98.38\pm 1.85)\%$, CD45 的表达呈阴性, 为 $(1.70\pm 2.84)\%$ 。符合典型的 BMSCs 表面标志物特点, 鉴定该细胞确为 BMSCs 细胞。

1.2 BMSCs 成骨分化能力鉴定

如图 1 所示: 传代至第 3~5 代的原代 BMSCs 细胞表现为梭形或成纤维样细胞, 成骨诱导 14 d 后, ALP 染色可见, 与未诱导细胞比较, 成骨诱导液干预的细胞在膜及胞浆内有明显的蓝黑色颗粒。成骨诱导 21 d 后, ARS 染色可见, 与未诱导细胞比较, 成骨诱导液干预的细胞中红色钙结节更加明显。

2 β -蜕皮甾酮对 BMSCs 细胞增殖分化的影响

CCK-8 实验结果显示, 用 β -蜕皮甾酮 (0.10 和 $1.00\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理的 BMSCs 的增殖活性与 $0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, 在第 1、3、5 和 7 天均显著升高 (均 $P<0.05$)。各组 BMSCs 细胞 450 nm 处的 OD 值, 见表 1。因此, 在本研究中选择了浓度为 0.01 、 0.10 和 $1.00\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -蜕皮甾酮用于后续实验。

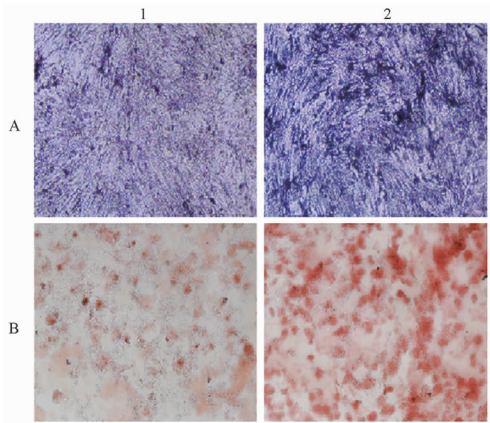


图1 骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化能力测定($\times 100$)
Figure 1 Bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) osteogenic differentiation ability assay ($\times 100$)
A: Alkaline phosphatase (ALP) staining; B: Alizarin red (ARS) staining;
1: Induction group; 2: Uninduced group.

3 β -蜕皮甾酮对 BMSCs 细胞成骨分化能力的影响
ALP 染色结果显示,低、中、高剂量组与对照组相比, BMSCs 细胞中的 ALP 染色阳性表达增加,且中、高剂量组的 ALP 染色阳性率深于低剂量组,见图 2A。ARS 染色结果显示,低、中、高剂量组与对照组相比,

矿化结节数量增加,且高剂量组的矿化结节数量高于低剂量组,见图 2B。

4 β -蜕皮甾酮对 BMSCs 细胞成骨分化标志基因表达的影响

中剂量组和高剂量组与对照组相比, *Runx2*、*ALP* 和 *Sp7* 的 mRNA 相对表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);低剂量组与对照组相比, *ALP* 和 *Runx2* mRNA 的相对表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);高剂量组与低剂量组相比, *Runx2*、*ALP* 和 *SP7* mRNA 相对表达均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 2。

5 β -蜕皮甾酮对 BMSC 细胞自噬以及 AMPK/mTOR 通路关键蛋白表达的影响

p-AMPK 和 LC3B 免疫荧光染色结果显示:低、中、高剂量组与对照组相比,p-AMPK 和 LC3B 蛋白相对表达水平均显著升高 ($P < 0.01$);中、高剂量组与低剂量组相比,p-AMPK 和 LC3B 蛋白相对表达水平均显著升高 ($P < 0.001$)。p-mTOR 和 P62 的免疫荧光染色结果显示:低、中、高剂量组与对照组相比,p-mTOR 和 P62 的蛋白相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.01$);高剂量组与低剂量组相比,p-mTOR 和 P62 的蛋白相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.01$),见表 3。

表1 各组 BMSCs 细胞的增殖活性的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the proliferative activity of BMSCs cells in each group($\bar{x} \pm s$)

Concentration($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	n	1 d	3 d	5 d	7 d
10.00	9	0.83 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.07 [#]	0.92 $\pm$ 0.09 [#]	1.03 $\pm$ 0.07
1.00	9	1.11 $\pm$ 0.06 [#]	1.27 $\pm$ 0.07 [#]	1.31 $\pm$ 0.07 [#]	1.50 $\pm$ 0.03 [#]
0.10	9	1.04 $\pm$ 0.08 [#]	1.24 $\pm$ 0.04 [#]	1.31 $\pm$ 0.06 [#]	1.38 $\pm$ 0.08 [#]
0.01	9	1.01 $\pm$ 0.08 [#]	1.16 $\pm$ 0.04 [#]	1.29 $\pm$ 0.04 [#]	1.24 $\pm$ 0.12
0	9	0.90 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.08	1.14 $\pm$ 0.08

Compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group, [#] $P < 0.05$.

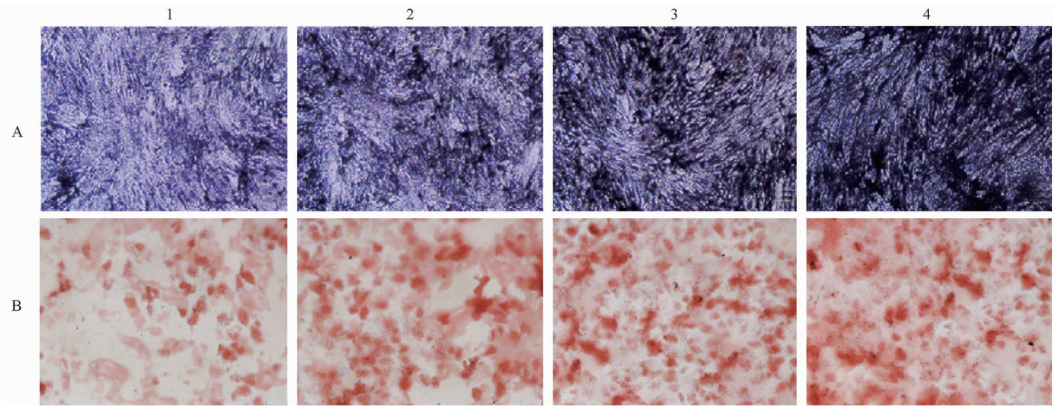


图2 用成骨染色法检测 β -蜕皮甾酮干预后细胞的成骨分化能力($\times 100$)

Figure 2 Osteogenic staining was used to detect the osteogenic differentiation ability of cells after β -ecdysterone intervention($\times 100$)
A: ALP staining; B: ARS staining; 1: Control group, normal culture; 2-4: Low-dose, middle-dose, high-dose groups, 0.01, 0.10 and 1.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -ecdysterone.

表2 β -蜕皮甾酮干预后各组细胞成骨标志基因的相对表达水平($\bar{x} \pm s$)Table 2 Relative expression of osteogenic marker genes in each group after β -ecdysterone intervention($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	ALP	SP7	Runx2
Control	9	1.01 $\pm$ 0.14 *	1.03 $\pm$ 0.25	1.00 $\pm$ 0.07 * *
Low - dose	9	1.22 $\pm$ 0.05 #	1.10 $\pm$ 0.17	1.45 $\pm$ 0.07 ##
Middle - dose	9	1.28 $\pm$ 0.05 #	1.41 $\pm$ 0.16 # *	2.11 $\pm$ 0.32 ## * *
High - dose	9	1.59 $\pm$ 0.20 ## *	1.94 $\pm$ 0.04 ## * *	4.67 $\pm$ 1.45 ## * *

Dose refer to figure 2; ALP: Alkaline phosphatase; SP7: Sp7 transcription factor; Runx2: Runt - related transcription factor 2; Compared with control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with low - dose group, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$.

表3 各组 BMSCs 免疫荧光结果的比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of immunofluorescence results of BMSCs in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	LC3B	p62	p - mTOR	p - AMPK
Control	9	0.07 $\pm$ 0.01 * *	1.72 $\pm$ 0.02 * *	0.66 $\pm$ 0.01 * *	0.07 $\pm$ 0.01 * *
Low - dose	9	0.20 $\pm$ 0.01 ## * *	1.67 $\pm$ 0.02 ## * *	0.40 $\pm$ 0.01 ##	0.11 $\pm$ 0.01 ##
Middle - dose	9	0.87 $\pm$ 0.05 ## * *	0.94 $\pm$ 0.01 ## * *	0.42 $\pm$ 0.01 ## * *	0.06 $\pm$ 0.01 ## * *
High - dose	9	1.27 $\pm$ 0.04 ## * *	0.04 $\pm$ 0.01 ## * *	0.04 $\pm$ 0.01 ## * *	0.18 $\pm$ 0.01 ## * *

Dose refer to figure 2; LC3B: Microtubule - associated protein 1 light chain 3 beta; p62: Sequestosome 1; p - mTOR: Phosphorylated mammalian target of rapamycin; p - AMPK: Phosphorylated adenosine 5' - monophosphate kinase - activated protein; Compared with control group, ## $P < 0.01$; Compared with low - dose group, * * $P < 0.01$.

讨 论

OP 是一种常见的慢性代谢性骨病^[6]。随着人口老龄化的加重,OP 患病率快速攀升,医疗保健成本大大增加,已成为重要的公共卫生问题。然而,目前 OP 的发病机制尚不明确,仍缺乏有效药物缓解骨质疏松带来的骨生成减少、骨质流失等问题。BMSCs 是一种具备多向分化潜能的成体干细胞群^[7]。在骨髓微环境中,BMSCs 向成骨细胞的分化是骨生成的关键步骤,其成骨分化可以影响骨髓脂肪生成,维持骨脂分化的平衡,也可以直接影响成骨能力,从而增强骨的稳定性。近年来,研究表明,药物缓解 OP 的发生可能与其增强 BMSCs 成骨能力密切相关^[8]。

植物中提取的 β -蜕皮甾酮是中药牛膝的重要活性成分,多项研究证明其对 OP 疗效显著,如汤样华等^[9]研究发现, β -蜕皮甾酮可以抑制大鼠 OP 模型的骨丢失,改善骨代谢。进一步研究表明, β -蜕皮甾酮能增加糖皮质激素干预后成骨细胞中的成骨基因表达水平,促进成骨细胞的分化与活性^[10]。已有的研究表明, β -蜕皮甾酮可以促进 BMSCs 的增殖、分化和自噬^[3]。因此,本研究用不同浓度的 β -蜕皮甾酮干预 BMSCs 细胞,分析 β -蜕皮甾酮对 BMSCs 细胞增殖、成骨分化以及自噬的影响,并研究其具体机制。本研究结果表明,0.01 ~ 10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量的 β -蜕皮甾酮均能够提高 BMSCs 的增殖活性,且浓度

为 0.01、0.10 和 1.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对细胞活性的促进作用较好。BMSCs 的成骨能力降低是 OP 骨质流失的重要原因之一。本研究结果表明,低、中、高剂量的 β -蜕皮甾酮可以显著提高 BMSCs 细胞的 ALP 和 ARS 染色的阳性率,且 β -蜕皮甾酮对 ALP 染色的阳性率的促进作用呈一定的剂量依赖性。用不同剂量的 β -蜕皮甾酮干预 BMSCs 能够显著提高细胞中的成骨标志性基因的表达,各剂量组的 β -蜕皮甾酮干预均能够显著提高 ALP mRNA 相对表达水平,中、高剂量组的 β -蜕皮甾酮干预可以显著提高成骨标志基因 Runx2、SP7 mRNA 表达。

自噬是细胞内高度保守的分解代谢过程,能够保护并促进细胞发挥正常功能^[11]。已有的研究发现,自噬异常会破坏骨重塑,导致 OP 的发生^[12]。调控自噬还能够促进 BMSCs 的增殖和成骨分化^[13]。AMPK/mTOR 信号通路是调控自噬的关键通路之一,激活 AMPK 可以抑制 mTOR 磷酸化触发自噬,促进 OP 小鼠骨形成^[14]。LC3 是调节自噬的标志性蛋白与自噬的水平正相关,p62 也是自噬的关键蛋白,与自噬的水平呈负相关^[15]。本研究发现, β -蜕皮甾酮各剂量组显著增加了 LC3B 的表达,降低了 p62 的表达,表明 β -蜕皮甾酮能够增强 BMSCs 细胞中的自噬水平。此外, β -蜕皮甾酮处理降低了 mTOR 蛋白磷酸化水平,增加了 AMPK 蛋白磷酸化水平,且高剂量组 β -蜕皮甾酮对 AMPK/mTOR 通路关键蛋白的干预作用较低剂量组更显著。

本研究提示: β -蜕皮甾酮能够通过调节 AMPK/mTOR 信号通路来提高骨髓间充质干细胞中的自噬水平促进其成骨分化, β -蜕皮甾酮有可能作为缓解 OP 骨生成减少、骨微结构破坏的潜在药物,但仍需进一步研究对其治疗作用及机制加以证明。

参考文献:

- [1] SÖZEN T, ÖZİŞİK L, BAŞARAN N. An overview and management of osteoporosis[J]. *EUR J AGRON*, 2017, 4(1): 46—56.
- [2] 商岚清, 刘永智, 周广智, 等. 从“骨肉不相亲”探讨牛膝活性成分 β -蜕皮甾酮论治骨质疏松的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(4): 254—258.
- [3] TANG Y H, YUE Z S, LI G S, *et al.* Effect of β -ecdysterone on glucocorticoid-induced apoptosis and autophagy in osteoblasts[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 158—164.
- [4] WANG L, FANG B, FUJIWARA T, *et al.* Deletion of ferroportin in murine myeloid cells increases iron accumulation and stimulates osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(24): 9248—9264.
- [5] 马伟凤, 王亮, 马彦巧, 等. 人参皂苷 Rg3 通过调节 AMPK/mTOR 信号通路提高骨质疏松老年大鼠骨密度及骨代谢[J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(1): 163—169.
- [6] 袁可馨, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 槲皮素介导 MAPK 信号通路防治骨质疏松的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(9): 1375—1379.
- [7] 李云龙, 黄炳哲, 李正伟, 等. 骨髓间充质干细胞干预治疗骨质疏松症中的骨组织生物力学性能[J]. *北京生物医学工程*, 2021, 40(1): 74—78, 84.
- [8] 安晋阳, 蒋娜, 刘进进, 等. 葛根素通过核因子 E2 相关因子 2 通路对骨髓间充质干细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(5): 684—688.
- [9] 汤样华, 辛大伟, 李国松, 等. β -蜕皮甾酮对激素性骨质疏松大鼠血清骨代谢指标及骨密度的影响[J]. *温州医科大学学报*, 2019, 49(2): 100—103.
- [10] 戴薇薇, 邢秋娟, 金国琴, 等. 糖皮质激素对成骨细胞活性与分化的影响及 β -蜕皮甾酮的干预作用[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(11): 3204—3207.
- [11] 王茜, 贾麒麟, 刘泽彪, 等. mTOR 经由自噬途径对骨质疏松的作用影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30(1): 129—133.
- [12] 代新宇, 李斌, 靳丹, 等. 运动通过调节骨自噬途径防治骨质疏松症的作用及可能机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(7): 1589—1603.
- [13] QI M, ZHANG L, MA Y, *et al.* Autophagy maintains the function of bone marrow mesenchymal stem cells to prevent estrogen deficiency-induced osteoporosis[J]. *Theranostics*, 2017, 7(18): 4498—4516.
- [14] 牛园园, 张天驰, 李沐哲, 等. 温肾通络止痛方通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬对老年性骨质疏松模型小鼠的干预作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2024, 44(1): 84—90.
- [15] 严文英, 姚靖. 枸杞多糖对 HK-2 细胞缺糖缺氧损伤后线粒体功能及自噬的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(24): 4010—4012, 4017.

(收稿日期 2024-07-15)

· 科学文摘 ·

低剂量螺内酯治疗中度慢性肾病的临床研究

引自: HOBBS F D R, *et al.* Low-dose spironolactone and cardiovascular outcomes in moderate stage chronic kidney disease: A randomized controlled trial [J]. *Nat Med*, 2024, 30(12): 3634—3645.

慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)与进展为终末期肾病和血管事件的显著风险相关。非甾体类矿物皮质激素受体拮抗药(mineralocorticoid receptor antagonist, MRA)非奈利酮为患有 CKD 和糖尿病的人群提供了心肾保护,但关于甾体类 MRA 螺内酯是否提供相同的保护仍存在不确定性。

在该项前瞻性、随机、开放、盲法终点试验中,研究者评估了螺内酯 25 mg 与常规治疗或仅常规治疗相结合对降低老年社区队列中 3b 期 CKD 患者心血管结局的有效性(平均年龄 = 74.8 岁,标准差 = 8.1)。该研究从英国的初级医疗中招募了 1 434 例胸腺法新成年人,其中 1 372 例胸腺法新(96%)参与了主要分析。主要结局是从随机分组到首次发生死亡、心脏病住院、卒中、心力衰竭、短暂性脑缺血发作或外周动脉疾病,或首次发生任何基线时未出现的疾病的时间。在 3 年的随访中,随机分配到螺内酯组的 677 例胸腺法新参与者中有 113 例胸腺法新(16.7%)发生了主要结局,而随机分配到常规治疗组的 695 例胸腺法新参与者中有 111 例(16.0%),2 组之间无显著性差异(风险比 = 1.05, 95% 置信区间: 0.81 ~ 1.37)。约三分之二随机分配到螺内酯组的参与者在 6 个月内停止了治疗,主要是因为符合预设的安全停药标准。停止使用螺内酯的最常见原因是估计的肾小管滤过率下降,符合预设的停药标准($n = 239, 35.4\%$),其次是因治疗药物不良反应($n = 128, 18.9\%$)和高钾血症($n = 54, 8.0\%$)而撤药。

该研究提示,螺内酯由于安全问题经常被停用,且没有证据表明其能减少 3b 期 CKD 患者的心血管结局。因此,除非有其他明确的治疗指征,否则不应将螺内酯用于 3b 期 CKD 患者。