

姜黄素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路 调控骨形成的机制

闫小龙¹, 秦英², 邵将³, 陈东峰³, 管东辉³, 赵灿斌⁴

(1. 山东中医药大学附属医院急诊重症医学中心, 山东 济南 250014; 2. 济南市长清区中医医院骨科, 山东 济南 250300;
3. 山东中医药大学附属医院骨科, 山东 济南 250014; 4. 广西中医药大学第一临床医学院, 广西 南宁 530200)

摘要: **目的** 探讨姜黄素对骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的潜在调控机制。**方法** 通过网络药理学方法获取姜黄素调控成骨分化的靶点基因, 构建蛋白质作用网络(protein-protein interactions, PPI), 并进行基因本体(Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析及分子对接处理。采用CCK-8法及细胞克隆筛选姜黄素药物浓度, 进一步采用ALP染色及活性测定、AR染色及定量分析检测姜黄素对成骨分化的宏观调控作用。采用RT-qPCR法及Western blotting法检测Wnt/ β -catenin信号通路相关mRNA及蛋白的微观表达差异。**结果** 筛选出姜黄素调控成骨分化的靶点基因92个, 主要涉及细胞内部对化学刺激、含氧化合物的反应等生物过程。其中, 有3个靶点基因作用于Wnt/ β -catenin信号通路, 且均可以与姜黄素良好对接。此外, 低浓度姜黄素(5、10 μ mol)对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, rBMSCs)增殖无明显毒性且可增强碱性磷酸酶活性、增加钙盐沉积量($P < 0.05$), 上调成骨相关基因及蛋白的表达($P < 0.05$), 从而促进rBMSCs成骨分化。而高浓度姜黄素(15 μ mol)对rBMSCs成骨分化过程有潜在的抑制作用。**结论** 姜黄素可以通过调控Wnt/ β -catenin信号通路影响成骨相关基因的表达, 进而调控BMSCs成骨分化过程。

关键词: 姜黄素; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 网络药理学; Wnt/ β -catenin信号通路

中图分类号: R274 **文献标志码:** A

Mechanism of curcumin regulating bone formation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway

YAN Xiaolong¹, QIN Ying², SHAO Jiang³, CHEN Dongfeng³, GUAN Donghui³, ZHAO Canbin⁴

(1. Emergency Intensive Care Medical Center, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong, China; 2. Department of Orthopedics, Jinan Changqing District Traditional Chinese Medicine Hospital, Jinan 250300, Shandong, China; 3. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong, China; 4. First Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China)

Abstract: Objective To explore the potential regulatory mechanism of curcumin on osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** The target genes of curcumin regulating osteogenic differentiation were obtained through network pharmacology, and a protein-protein interaction network (PPI) was constructed. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis and molecular docking were performed. CCK-8 and cell cloning were used to screen the concentration of curcumin. ALP stai-

ning and activity assay, AR staining and quantitative analysis were used to evaluate the macro-regulatory effect of curcumin on osteogenic differentiation. RT-qPCR and Western blotting were used to detect the micro-expression differences of mRNA and protein related to the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Results** A total of 92 target genes for curcumin regulation of osteogenic differentiation were screened, mainly involving biological processes such as the intracellular response to chemical stimuli and the response to oxidative compounds. Three target genes acted on the Wnt/ β -catenin signaling pathway and could be effectively docked with curcumin. In addition, low concentrations of curcumin (5, 10 μ mol) showed no obvious toxicity to rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (rBMSCs), enhanced alkaline phosphatase activity, increased calcium deposition ($P < 0.05$), up-regulated the expression of osteogenic-related genes and proteins ($P < 0.05$), and promoted osteogenic differentiation of rBMSCs. However, high concentration of curcumin (15 μ mol) had a potential inhibitory effect on the osteogenic differentiation of rBMSCs. **Conclusion** Curcumin can regulate the expression of osteogenic-related genes by modulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway, thereby regulating the osteogenic differentiation of BMSCs.

Key words: Curcumin; Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Network pharmacology; Wnt/ β -catenin signaling pathway

骨质疏松症是一种全身代谢性骨病,其特征是骨质流失、骨组织微结构损伤、骨痛和脆性骨折^[1],骨质疏松症发病的主要机制是成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收之间的不平衡,骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)的数量减少和功能衰退亦是导致骨质疏松症形成机制之一^[2]。BMSCs是一种具有自我更新、多向分化潜能的细胞,在特定条件下具有向成骨细胞分化的能力,并有益于诱导骨形成^[3]。研究表明,BMSCs具有治疗与年龄进展相关退行性疾病的潜力,BMSCs的衰老过程在骨质疏松症发生、发展中起重要作用^[4]。促进 BMSCs 成骨分化可能是骨修复,治疗骨质疏松症的潜在策略。然而目前该类药物多因不良反应而治疗效果欠佳^[5]。寻找可以促进 BMSCs 成骨分化并有着低不良反应的药物显得尤为迫切。

传统的中草药历史悠久,据报道,许多天然的中草药产品可以减少骨质流失^[6]。《本草纲目》记载:姜黄,治风寒湿气肩臂痛。《伤科方书》也记载姜黄可以治跌打损伤,瘀肿疼痛,常配伍苏木、乳香、没药等药。姜黄素作为姜黄的重要活性成分,具有抗动脉硬化、抗肿瘤等功效^[7-8]。研究表明,姜黄素可以抑制与骨质疏松相关因子 TNF- α 在绝经后女性体内升高,还可以通过上调碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, Ocn)等基因的表达,诱导小鼠胚胎间充质干细胞的成骨细胞分化^[9-10]。此外,姜黄素可以治疗糖基化引起的骨质疏松症^[11]。研究表明,低骨量的人服用含有姜黄素的口服剂可以增强小指和上颌骨的骨密度^[12]。然而,姜黄素对于体外 BMSCs 成骨分化的调控机制及分子层面的相关研究目前尚未有比较全面的报道。

目前,姜黄素治疗骨质疏松的临床疗效已得到证实,但其复杂的药理作用和作用机制尚不明确。Wnt/ β -catenin 信号通路是骨形成的关键信号调控通路之一,在 BMSCs 成骨分化的过程中发挥着重要作用。研究表明,阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路中 GSK-3 β 介导的 β -catenin 降解,可以促进 Runx2 及相关成骨基因的转录而促进成骨^[13]。本研究旨在利用网络药理学方法,佐以实验验证,研究姜黄素通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, rBMSCs)成骨分化来治疗骨质疏松症的机制,为姜黄素对于骨质疏松症的临床治疗和相关科研领域拓展新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器

rBMSCs(商品号:RASM-X-01001)购自中国广州赛业生物科技有限公司(其外观形态、生长状态、成骨分化能力及表面标记分子已通过验证,且支原体检测为阴性)。姜黄素(商品号:C7090)购自中国北京索莱宝科技有限公司。BCIP/NBP 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(商品号:C3206)购自中国碧云天生物科技有限公司。茜素红染色液(商品号:G1038)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂(商品号:DP424)购自中国天根生化科技(北京)有限公司。Western 一抗稀释液(商品号:G2025)、Western 二抗稀释液(商品号:G2009)购自中国武汉赛维尔生物科技有限公司。 β -CATENIN 抗体(商品号:ET1601-5)购自中国华

安生物科技有限公司。二氧化碳培养箱(商品号: BPN-80CH)购自上海一恒科学仪器有限公司。超净工作台(商品号: SW-CJ-1FD)购自中国苏净安泰空气技术有限公司。酶标仪(商品号: CMaxPlus)购自美国 Molecular Devices 公司。倒置荧光显微镜(商品号: CKX53)购自日本 Olympus 公司。离心机

(商品号: DM04129)购自美国 Scilogex 公司。高速组织研磨仪(商品号: KZ-II)购自中国武汉赛维尔生物科技有限公司。RT-qPCR 目的基因引物购自中国北京鼎国昌盛生物科技有限责任公司,具体序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列信息
Table 1 Primers for RT-qPCR examination

名称	序列(5'-3')	名称	序列(5'-3')
β-Catenin-F	GCCGTTTCGCTTCATTATGG	β-Catenin-R	GGTGTCTCGATGTGCTCGTA
Gsk3β-F	GACACACCTGCCCTCTTCAA	Gsk3β-R	AGAAGCGGCGTTATTGGTCT
Pka-F	TTAGCAAGCCACAATGCTCAG	Pka-R	CCACATAGCTCGGAAACCCAT
Cbp-F	TGTGGAGGGCTTGTAGCATT	Cbp-R	AAAAGAGCCCAAATGTCTGGA
Lef-1-F	AAGCCTCAGCACGAACAGA	Lef-1-R	CTTCCTCTTCTTCTTCTTGCCATA
Runx2-F	TCGCCTCACAACAACCACA	Runx2-R	AGGCTGTTTGACGCCATAGT
c-Myc-F	CTATCACCAGCAACAGCAGAG	c-Myc-R	AACATAGGACGGAGAGCAGAG
Cyclin d1-F	CCAGAGGCGGATGAGAACA	Cyclin d1-R	CGGTAGCAGGAGAGGAAGTT
Bmp2-F	GCATCGCGCCCTTATCC	Bmp2-R	TTCCTCGATGGCTTCTTCGT
Ocn-F	AAGTCCCACACAGCAACTCG	Ocn-R	TCCATTGTTGAGGTAGCGCC
Opn-F	CACTCCAATCGTCCCTAC	Opn-R	AGACTCACCGCTCTTCAT
Osterix-F	ACCTGTCTGCTCTGCTCCA	Osterix-R	CGGCTGATTGGCTTCTTCTTC
β-Actin-F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	β-Actin-R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1.2 方法

1.2.1 网络药理学

1.2.1.1 姜黄素作用靶点基因与成骨分化靶点基因的筛选

使用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站获取姜黄素 2D 结构的 SDF 文件,并使用 SwissTargetPrediction (www.swisstargetprediction.ch) 及 PharmMapper 工具 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharm-mapper/>) 进行药物靶点预测。运用 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 以“Osteogenic differentiation”为关键词进行检索成骨分化靶点基因。

1.2.1.2 药物靶点与成骨分化靶点的 Venn 分析

将所得的姜黄素作用靶点基因与成骨分化靶点基因导入 Omicshare 网站 (<https://www.omicshare.com/>) 进行分析,得到两者交集,即为姜黄素调控成骨分化的相关靶点基因。

1.2.1.3 构建蛋白质相互作用关系网络 (protein-protein interactions, PPI)

通过 String 数据库 (<https://www.string-db.org>) 将交集靶点基因绘制 PPI 网络图,使用 Cytoscape3.8.0 拓扑计算并优化 PPI 网络图。

1.2.1.4 基因本体 (Gene Ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析

通过 Omicshare 网站分析姜黄素调控成骨分化

的相关靶点基因信息,得到 GO 富集分析结果(包括生物过程,细胞成分,分子功能)及 KEGG 通路富集分析结果。

1.2.1.5 分子对接验证

从 PPI 网络中筛选参与 Wnt/β-catenin 信号通路相关的靶点基因,由 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 获取结构文件,并利用 Auto Dock 4.2.6 软件进行其与姜黄素的分子对接。最后通过 Pymol 2.4.0 软件进行可视化分析。

1.2.2 细胞实验

1.2.2.1 采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法检测不同浓度姜黄素的细胞毒性

将 rBMSCs 以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中,培养至细胞贴壁,用 0、5、10、15、25 μmol 姜黄素(所有浓度的姜黄素中均加入 0.1% 的 DMSO 助溶)处理,分别记为 0、5、10、15、25 μmol 姜黄素组。孵育 24、48、72 h 后,加入 CCK-8 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h 后,在 450 nm 的波长下测量吸光度。

1.2.2.2 细胞克隆检测

将 rBMSCs 以 8×10^2 /皿的密度接种到 6 cm 培养皿中培养至细胞贴壁,然后加入 0、5、10、15、25 μmol 姜黄素处理,培养 10 d。将给药处理后的细胞以 4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染液染色并拍照。用 ImageJ 软件分析计算克隆数目。

1.2.2.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色、活性测定及茜素红(alizarin red, AR)染色、定量分析

ALP 染色、活性测定:将 rBMSCs 以 2×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中,培养至细胞贴壁率达到 70%~80%,加入含不同浓度姜黄素的 rBMSCs 成骨分化诱导培养基培养 7 d,采用 BCIP/NBT ALP 显色试剂盒进行染色,采用微量酶标法 ALP 测试盒进行活性测定。

AR 染色、定量分析:接种方式同 ALP 染色、活性测定,将 rBMSCs 使用含不同浓度的姜黄素 rBMSCs 成骨分化诱导培养基培养 14 d,采用 AR 染色液染色。将染色的钙化结节在室温下用 10% 十六烷基氯化吡啶一水合物(Sigma-Aldrich)溶解,在 562 nm 波长下检测吸光度。

1.2.2.4 采用 RT-qPCR 法检测细胞中 mRNA 的表达量

将 rBMSCs 以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中培养,至细胞贴壁率达到 70%~80%,加入含不同浓度姜黄素的 rBMSCs 成骨分化诱导培养基培养 7 d。诱导完成后采用 Trizol 法收集细胞总 RNA,进行 cDNA 的逆转录与扩增(逆转录条件为 37 °C 合成单链 cDNA 25 min; 85 °C 合成双链 cDNA 10 s; 4 °C 保存,∞。扩增条件为 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 延伸 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 72 °C 最终延伸 2 min, 共 40 个循环。),采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算结果。

1.2.2.5 采用 Western blotting 法检测细胞中的蛋白表达量

给药方式同 RT-qPCR 法。给药完成后提取细

胞内总蛋白,计算蛋白浓度后,每孔加入 20 μ L 蛋白样本进行 SDS-PAGE 电泳,随后进行转膜、封闭和一抗过夜孵育。室温下二抗孵育,洗膜后进行发光处理。将蛋白质表达水平相对于 β -ACTIN 及 HISTONE H3 标准化。采用 Gelpro 32 4.0 软件对条带进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件,CCK8 实验每组设置 10 次重复,其他实验设置 3 次重复,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以单因素方差分析进行数据处理,采用 LSD 法进行事后检验。采用 Graph pad Prism 9.4.1 绘制图片。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 姜黄素及成骨分化靶点的筛选

通过 SwissTargetPrediction 及 PharmMapper 靶点预测工具得到姜黄素的作用靶点 261 个。通过 genecards 数据库中检索到与成骨分化相关的靶点基因 1 375 个。

2.1.2 药物与疾病靶点的 Venn 图建立

将 1 375 个成骨分化靶点与 261 个姜黄素药物靶点进行 Venn 分析,共得到姜黄素潜在作用于成骨分化的 92 个靶点。见图 1A、B。

2.1.3 蛋白相互作用网络(protein-protein interactions, PPI)的构建

除去 3 个未参与 PPI 的靶点基因,共有 89 个靶点基因参与 PPI 的构建。见图 1C。

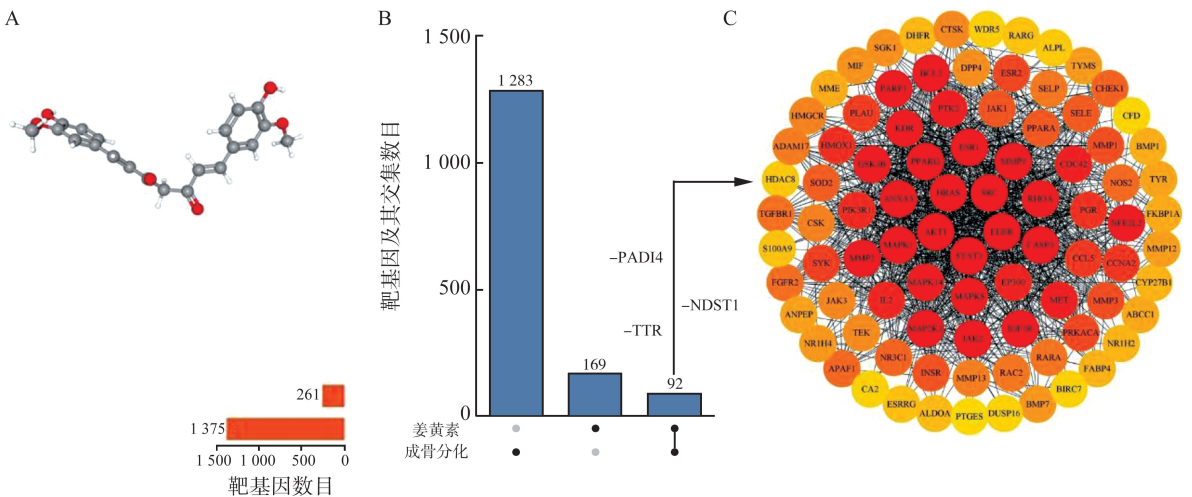


图 1 姜黄素调控成骨分化相关靶点信息

A: 姜黄素的 3D 结构式; B: 姜黄素调控成骨分化相关靶点 upset VENN 图; C: 经 Cytoscape 3.8.0 渲染后的 PPI 网络图,其中 3 个(TTR, PADI4, NDST1)未参与 PPI 构建的靶点已隐去。

Figure 1 Curcumin regulates target related to bone differentiation

A: The 3D structure of curcumin; B: The upset VENN diagram of curcumin regulation on bone differentiation-related targets; C: PPI network diagram rendered by Cytoscape 3.8.0, with three targets (TTR, PADI4, NDST1) that were not involved in PPI construction omitted.

2.1.4 GO、KEGG 富集分析与分子对接

在 GO 功能富集分析中,生物过程涉及对有机质的反应、对含氧化合物的反应、细胞内对化学刺激的反应等;细胞成分涉及细胞膜筏、细胞膜微结构、黏着斑等;分子功能涉及离子结合、作用于蛋白的催化活性、蛋白酶活性等。在 KEGG 信号通路富集分析中,多数靶点参与癌症信号通路的调控,包括 Wnt/ β -catenin 信号通路。其中涉及调控 Wnt/ β -

catenin 信号通路的分别为 GSK3 β 、PRKACA 及 EP300。姜黄素与 GSK3 β 、PRKACA 及 EP300 结合小于 -17.982 J/mol,有着较强的结合活性^[14]。其中,姜黄素通过与 SER-147 形成一个氢键结合到 GSK3 β ,通过与 HIS-131 形成两个氢键结合到 PRKACA,通过与 ASP-1080 及 GLN1077 分别形成一个氢键结合到 EP300。见图 2。

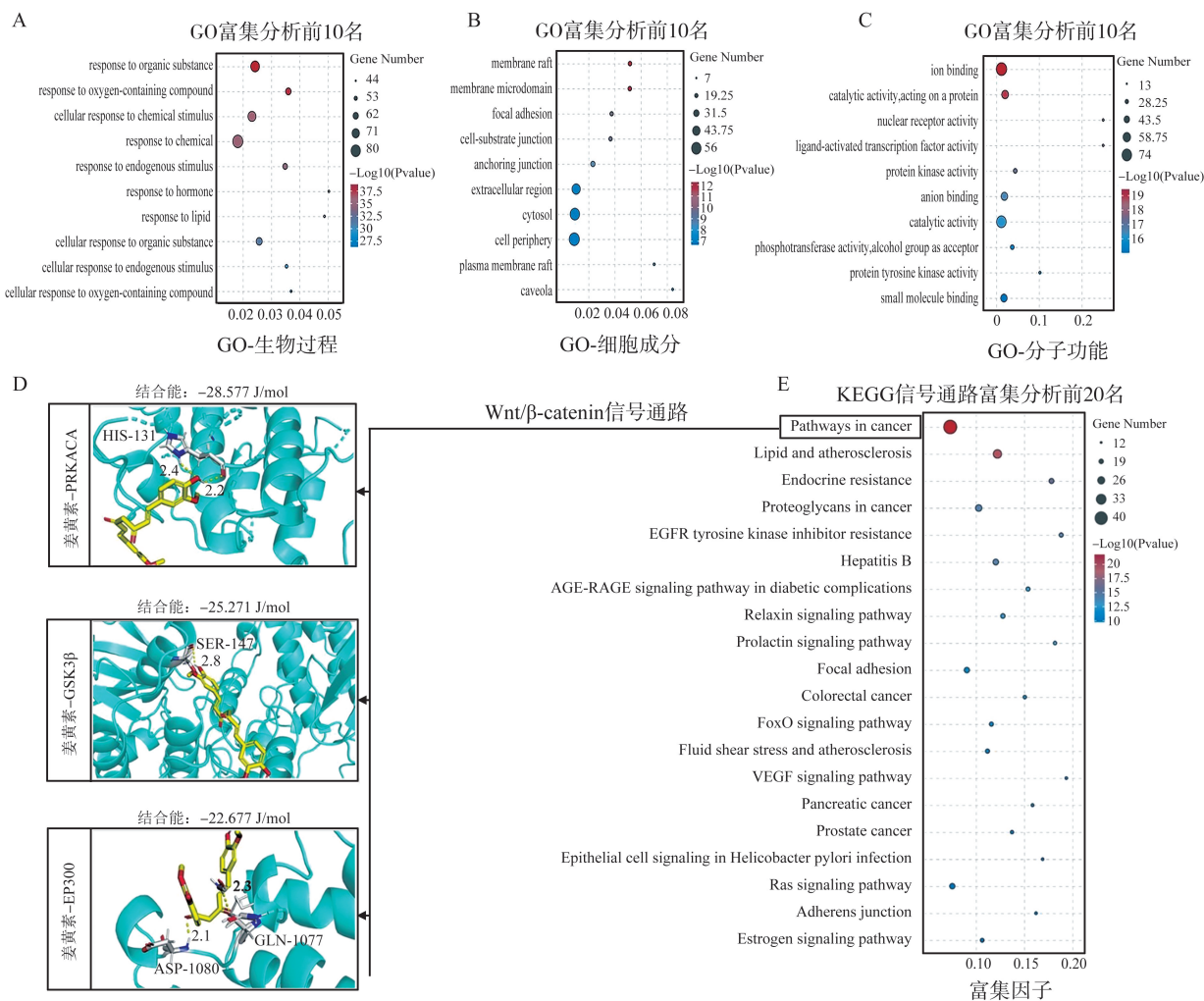


图 2 GO、KEGG 富集分析与分子对接结果

A:生物过程;B:细胞成分;C:分子功能;D:姜黄素与 PRKACA、GSK3 β 及 EP300(其中,对接位点名称,氢键长度及对接能如图所示);E:KEGG 信号通路富集分析图。[气泡图中 Count 值越大,圆圈面积越大, $-\log_{10}(P\text{值})$ 越大,颜色越红]

Figure 2 Result of GO and KEGG enrichment analysis and molecular docking

A: Biological processes; B: Cellular components; C: Molecular functions; D: Curcumin with PRKACA, GSK3 β , and EP300 (where docking site name, hydrogen bond length, and docking energy are shown in the figure); E: KEGG pathway enrichment analysis diagram. [In the bubble plot, the larger the Count value, the larger the circle area, the larger the $-\log_{10}(P\text{value})$, and the redder the color]

2.2 实验验证结果

2.2.1 各浓度姜黄素组对细胞活力的影响

与 0 μmol 姜黄素组相比,加药 24 h, 5、10、15 μmol 姜黄素组细胞活力无明显变化, 25 μmol 姜黄素组细胞活力显著降低 ($P < 0.05$); 加药 48 h,

5、10 μmol 姜黄素组细胞活力无明显变化, 15、25 μmol 姜黄素组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$); 加药 72 h, 5、10 μmol 姜黄素组细胞活力明显升高 ($P < 0.05$), 15、25 μmol 姜黄素组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

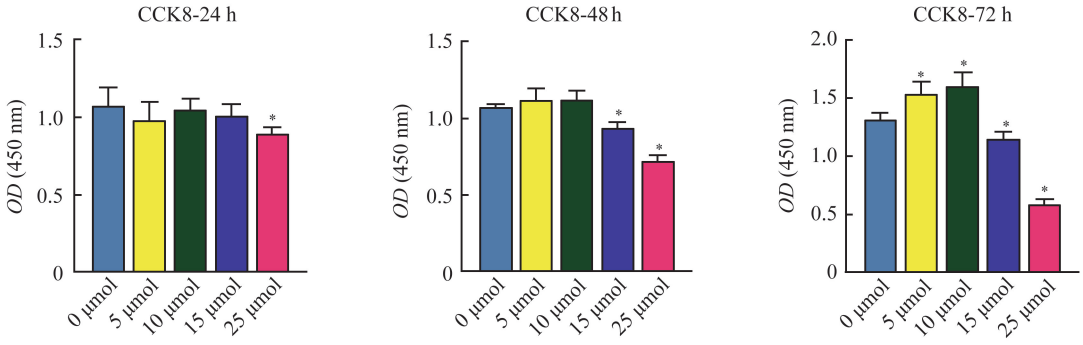


图3 CCK8实验 加药24,48,72 h各浓度姜黄素对细胞活力的影响(* $P < 0.05$ vs. 0 μmol姜黄素组)

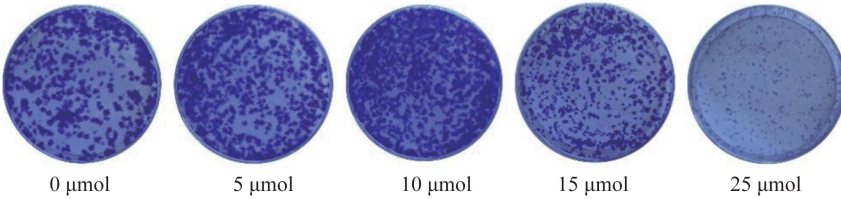
Figure 3 CCK8 experiment and cell cloning formation experiment. The effect of different concentrations of curcumin at 24, 48, and 72 h on cell viability (* $P < 0.05$ vs. 0 μmol curcumin group)

2.2.2 各浓度姜黄素组对细胞体外增殖的影响

与0 μmol姜黄素组相比,5、10 μmol组姜黄素组细胞增殖能力增强($P < 0.05$),15 μmol姜黄素组

细胞增殖能力未出现明显变化,25 μmol姜黄素组细胞增殖能力明显下降($P < 0.05$)。见图4。

A



B

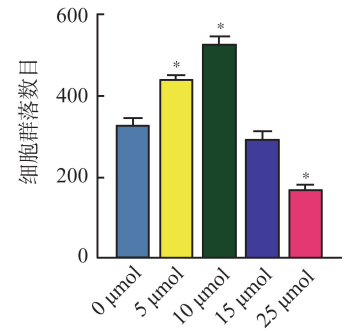


图4 细胞克隆形成实验

A: 细胞克隆实验图像; B: ImageJ 软件分析计算克隆数目(* $P < 0.05$ vs. 0 μmol姜黄素组)。

Figure 4 cell cloning formation experiment

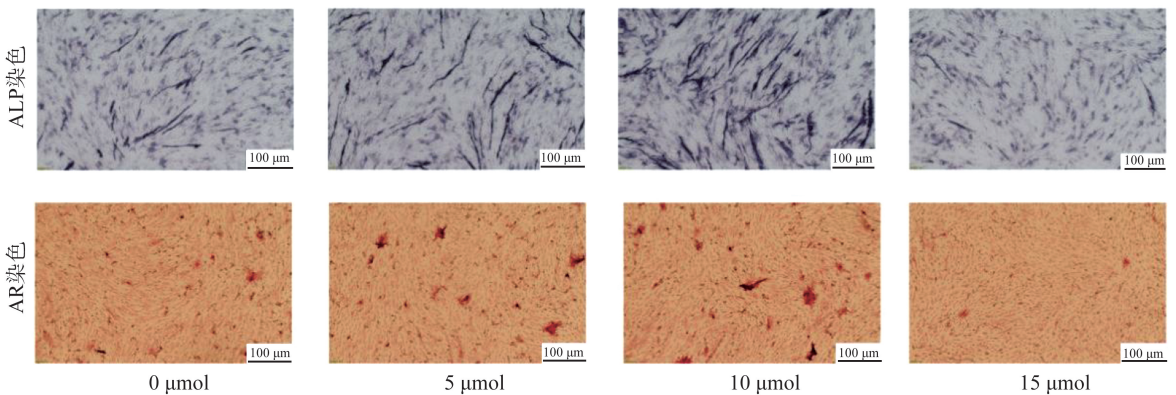
A: Images of cell cloning experiment; B: Cloning number analysis using ImageJ software (* $P < 0.05$ vs. 0 μmol curcumin group).

2.2.3 各浓度姜黄素组对细胞 ALP 活性、钙盐沉积的影响

ALP 染色、活性测定显示,与0 μmol姜黄素组相比,5、10 μmol姜黄素组染色逐渐加深,15 μmol姜黄素组染色变浅。5、10 μmol姜黄素组 ALP 活性显著升高($P < 0.05$),15 μmol姜黄素组 ALP 活性显

著降低($P < 0.05$)。AR 染色、定量分析显示:与0 μmol姜黄素组相比,5、10 μmol姜黄素组钙沉积明显增多,15 μmol姜黄素组钙沉积减少。AR 定量分析显示,5、10 μmol姜黄素组 AR 含量显著升高($P < 0.05$),15 μmol姜黄素组 AR 含量无明显变化。见图5。

A



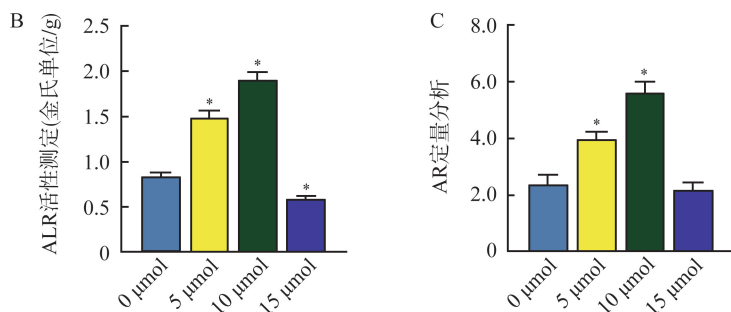


图5 ALP、AR染色镜下图像及ALP活性测定、AR定量分析结果(* $P < 0.05$ vs. 0 μmol 姜黄素组)

A:不同浓度姜黄素ALP染色和AR染色显微镜图像($\times 100$);B:不同浓度姜黄素干预下ALP活性变化;C:不同浓度姜黄素干预下AR定量变化。

Figure 5 ALP and AR staining images under the microscope and ALP activity determination, AR quantitative analysis results(* $P < 0.05$ vs. 0 μmol curcumin group)

A: Microscope images ($\times 100$) of ALP staining and AR staining at different concentrations of curcumin; B: Changes in ALP activity under different concentrations of curcumin intervention; C: Changes in AR quantitative under different concentrations of curcumin intervention.

2.2.4 各浓度姜黄素组对细胞成骨相关mRNA表达的影响

与0 μmol 姜黄素组相比,5、10 μmol 姜黄素组中的Wnt/ β -catenin信号通路中Cbp、Pka、 β -catenin、Lef-1、c-Myc、Cyclin D1及下游成骨基因

Bmp2、Ocn、Opn、Osterix、Runx2的mRNA表达量显著上升($P < 0.05$),Gsk3 β 的mRNA表达量显著下降($P < 0.05$)。当姜黄素浓度达到15 μmol 时,Cbp、 β -catenin的mRNA表达量显著降低($P < 0.05$),Gsk3 β 的mRNA表达量显著上升($P < 0.05$)。见图6。

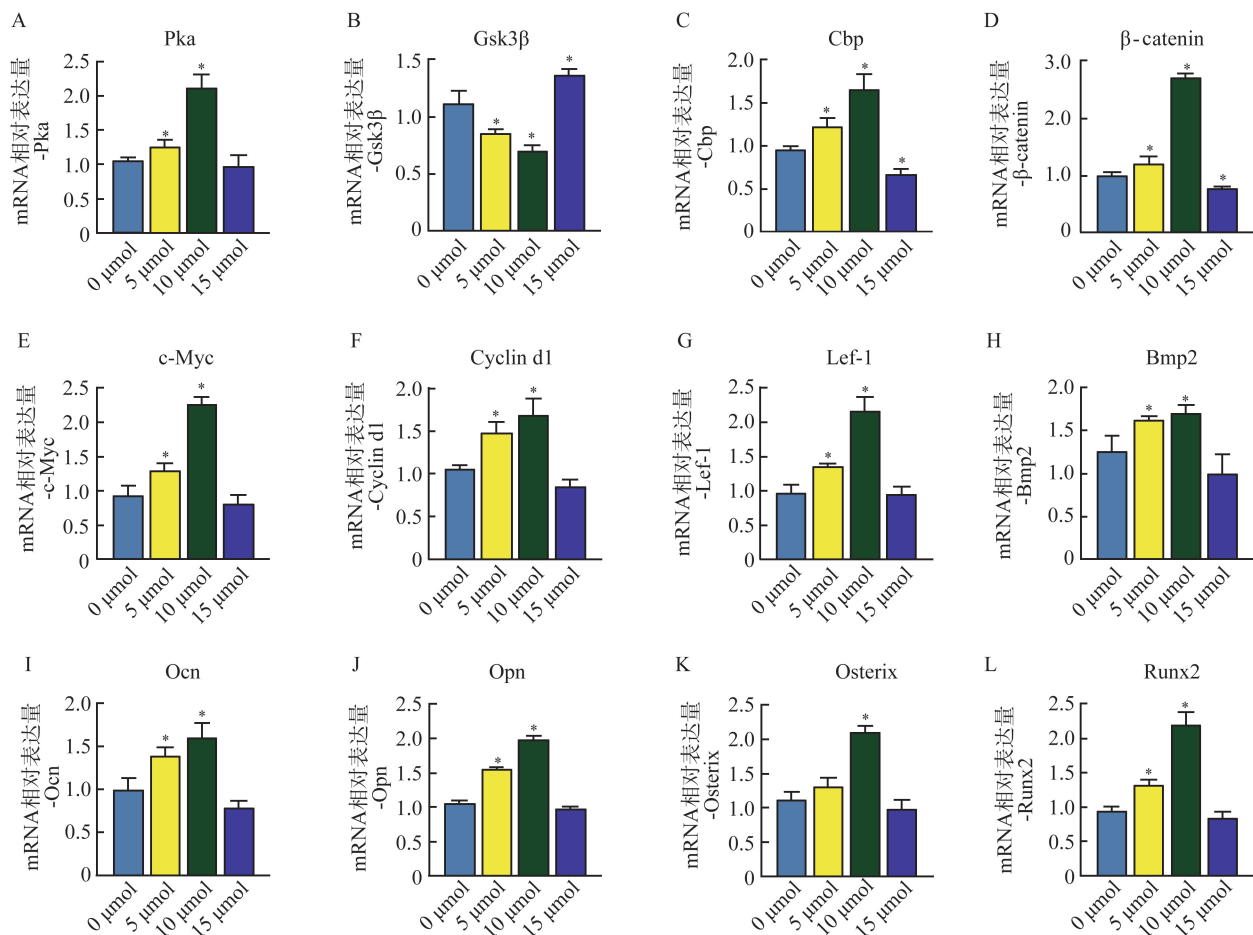


图6 Wnt/ β -catenin信号通路及下游成骨相关基因的mRNA表达(* $P < 0.05$ vs. 0 μmol 姜黄素组)

Figure 6 mRNA expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway and downstream osteogenic-related genes (* $P < 0.05$ vs. 0 μmol curcumin group)

2.2.5 各浓度姜黄素组对细胞成骨相关蛋白表达的影响

与 0 μmol 姜黄素组相比, 5、10 μmol 姜黄素组 Wnt/ β -catenin 信号通路中的 CBP、PKA、LEF-1、RUNX2、c-MYC、CYCLIN D1 的蛋白表达量及下游成骨蛋白 BMP2、OCN、OPN、OSTERIX、RUNX2 显

著上升($P < 0.05$), 且细胞核内 β -catenin 比重上升($P < 0.05$), 胞浆内 β -catenin 比重下降($P < 0.05$), GSK-3 β 的蛋白表达量下降($P < 0.05$)。当姜黄素浓度达到 15 μmol 时, c-MYC 及 RUNX2 蛋白的表达明显下降($P < 0.05$)。见图 7。

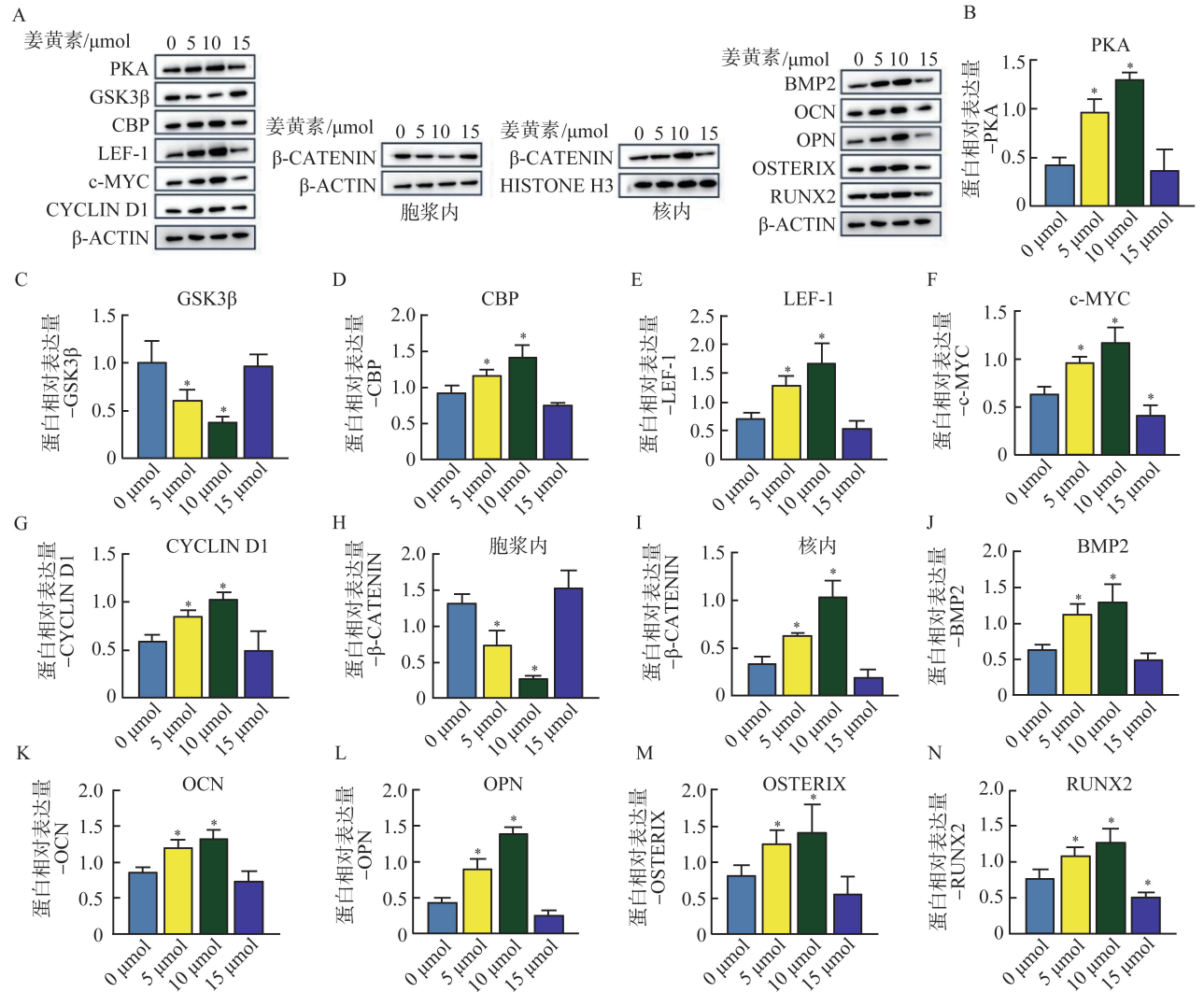


图 7 Wnt/ β -catenin 信号通路及下游成骨相关基因的蛋白表达

A: 相关蛋白的表达; B~N: 各蛋白表达趋势图 (* $P < 0.05$ vs. 0 μmol 姜黄素组)。

Figure 7 Wnt/ β -catenin signaling pathway and protein expression of downstream osteogenic genes

A: Protein expression levels of the related proteins; B-N: Trend graphs of protein expression for each protein (* $P < 0.05$ vs. 0 μmol curcumin group).

3 讨论

随着全球老龄化进程的加快, 骨质疏松症已成为三大常见慢性病之一^[15]。现代医学对骨质疏松症的治疗主要包括钙、维生素补充剂和雌激素替代疗法。然而, 长期使用雌激素会增加乳腺癌和冠心病的发病率, 临床上常用的化学合成药物也具有一定的不良反应^[16]。姜黄素作为一种提取自干姜科姜黄属根茎中

的天然多酚化合物, 在诸多亚洲国家作为草药使用的历史颇为久远^[17], 其作用靶点多参与骨重塑的调控过程^[18]。研究发现, 姜黄素可以通过 Nrf2 信号通路促进炎症状态下牙周膜干细胞的成骨分化^[19]。另一方面, 姜黄素的细胞毒性可能会对细胞活性及成骨分化过程产生负面作用。本研究结果发现, 5、10 μmol 姜黄素不会对 rBMSCs 的增殖活力及成骨分化过程产生负面影响。ALP 染色及活性测定显示, 5、10 μmol 姜黄素使得细胞 ALP 染色着色加深, 且可以

增强细胞内 ALP 活性。成骨细胞分泌 ALP,后者在骨形成、转换及代谢过程中发挥着重要作用^[20]。据报道,ALP 与成骨细胞活性密切相关,在骨形成过程中,ALP 可促进骨基质矿化,当机体骨小梁减少时,血清 ALP 水平升高促进骨量代偿性增加^[21]。此外,茜素红染色及定量分析显示,5、10 μmol 姜黄素可促进使得茜素红染色加深,促进细胞内钙盐沉积,促进成骨分化后期骨基质矿化^[22]。故低浓度(5、10 μmol)姜黄素在促进成骨分化方面有着低毒性、多靶点的优势,可加速体外成骨进程。

Wnt/ β -catenin 信号通路在成骨分化、骨形成的调节机制中发挥重要作用。Wnt 信号通路是由 Wnt 家族分泌的脂质修饰蛋白激活的细胞间信号级联反应,包括依赖 β -连环蛋白(β -catenin)的经典 Wnt 信号通路和不依赖 β -catenin 的非经典 Wnt 信号通路,主要调节 BMSC 和骨祖细胞的增殖和分化^[23]。阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路中 GSK-3 β 介导的 β -catenin 降解,可启动 Runx2 基因的转录,促进 BMSCs 成骨分化^[24]。本研究结果发现,在姜黄素促进成骨分化的 PPI 网络图中,GSK3 β 、PRKACA 及 EP300 等 3 个靶点基因涉及调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,其中,PRKACA 是 PKA 的催化亚基之一^[25],EP300 与 CBP 作为转录共激活因子,两者特异性分子过程极度相似且具有高度相似的序列同源性^[26]。故姜黄素可通过影响 GSK3 β 、PKA、CBP 的表达调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,进而影响 BMSCs 成骨分化过程。

PKA 可参与一系列信号因子的磷酸化过程^[27],其介导的信号通路与 Wnt/ β -catenin 信号通路关系密切。CBP 是 p300 的辅助转录激活因子,两者具有功能上的高度同源性,抑制 CBP 与 β -catenin 结合,可降低后者活性^[28]。GSK3 β 与 LEF-1 均为 Wnt/ β -catenin 信号通路的重要组成部分,磷酸化 GSK3 β 抑制其活性可使 β -catenin 在胞质中的积累并促进其入核,且 LEF-1 可指导 β -catenin 入核定位,并结合 β -catenin 促进下游基因转录^[29-30]。Cyclin D1 与 c-myc 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游靶基因,对成骨过程有着重要的调控作用,上调 Cyclin D1、c-Myc 表达可加快成骨分化进程^[31-32]。Runx2 是骨形成过程中主要转录因子之一,其可促进细胞矿化及骨基质钙盐沉积,并在调节成骨细胞特异性基因如 Osx 和 Ocn 的表达中起着关键作用^[33-34]。Bmp2 信号通路在成骨分化中具有重要作用。Bmp2 与其受体结合,导致 Smad1/5/9 磷酸化,激活 Smads,并促进其核转位,从而调节成骨相关基因的表达^[35],上调 Bmp2 表达有助于 MC3T3-E1 的增殖和成骨分化,且可改善异常的

骨代谢环境^[36]。此外,BMSCs 中外源性添加 Bmp2 或过表达 Bmp2 可促进成骨分化和受损骨组织的修复^[37]。OCN 在细胞的成骨分化过程中起着积极的调节作用。OCN 表达上调促进 MC3T3-E1 的成骨分化并促进骨折愈合^[38-39]。同样,OPN 作为骨代谢的重要指标,调节骨基质矿化^[40-41]。OPN 的过表达在促进骨组织再生方面具有重要意义^[42]。另一种仅在骨组织细胞中表达的成骨特异性转录因子是 Osterix,它对成骨分化和骨生成过程至关重要^[43],其表达增加可以延缓骨吸收过程,缓解与骨质疏松症相关的异常症状^[44]。本研究通过体外细胞实验发现,5、10 μmol 姜黄素可上调 BMSCs 中 Cbp、Pka、 β -catenin、Lef-1、c-Myc、Cyclin d1、Bmp2、Ocn、Opn、Osterix、Runx2 基因的表达,下调 Gsk3 β 基因的表达。此外,其可促进胞浆内 β -CATENIN 蛋白向细胞核内位移,使核内 β -CATENIN 比重上升,与前人相关研究成果有着高度一致性。

然而,本研究仍存在不足之处。在 PPI 网络中,相比于 AKT1、STAT3、SCR 而言,GSK3 β 、EP300 及 PRKACA 并不处于核心位置,可能 AKT1 等靶点基因的表达在调控成骨分化过程中发挥着更加强有力的作用,本研究并未选取该类蛋白作为分析对象,无法验证该类基因的表达对成骨分化的影响。本研究仅以体外细胞实验验证姜黄素调控成骨分化的机制,缺乏其对促进体内成骨的进一步研究与探讨,故后续应将继续通过动物实验验证姜黄素对体内成骨的作用机制。

本研究结果显示,姜黄素在相对较低浓度(5、10 μmol)下可促进体外 rBMSCs 的增殖和成骨分化。然而,在相对较高浓度(15 μmol)下,姜黄素不能促进 rBMSCs 的增殖,并对其成骨分化过程具有潜在的抑制作用。结果表明一定浓度的姜黄素在防治骨质疏松症方面具有潜在优势,并为其临床应用提供了合理的依据。

参考文献:

- [1] Fuggle NR, Curtis B, Clynes M, et al. The treatment gap: the missed opportunities for osteoporosis therapy [J]. Bone, 2021, 144: 115833. doi: 10.1016/j.bone.2020.115833.
- [2] Hu M, Xing L, Zhang L, et al. NAP1L2 drives mesenchymal stem cell senescence and suppresses osteogenic differentiation[J]. Aging Cell, 2022, 21(2): e13551.
- [3] Yang W, Li HY, Wu YF, et al. ac4C acetylation of RUNX2 catalyzed by NAT10 spurs osteogenesis of BM-

- SCs and prevents ovariectomy-induced bone loss[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 135-147. doi: 10.1016/j.omtn.2021.06.022.
- [4] Liu F, Yuan Y, Bai L, et al. LRRc17 controls BMSC senescence via mitophagy and inhibits the therapeutic effect of BMSCs on ovariectomy-induced bone loss[J]. *Redox Biol*, 2021, 43: 101963. doi: 10.1016/j.redox.2021.101963.
- [5] Lu J, Hu D, Ma C, et al. Advances in our understanding of the mechanism of action of drugs (including traditional Chinese medicines) for the intervention and treatment of osteoporosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 938447. doi: 10.3389/fphar.2022.938447.
- [6] Freires IA, Santaella GM, de Cássia Orlandi Sardi J, et al. The alveolar bone protective effects of natural products: a systematic review[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 87: 196-203. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.019.
- [7] 吴彧,夏彦清,伍玥,等.炎性细胞模型中姜黄素对胆固醇逆转运蛋白 ABCA1 和 ABCG1 基因的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2016, 54(11): 24-26.
WU Yu, XIA Yanqing, WU Yue, et al. The effect of curcumin on the expression of ABCA1 and ABCG1 genes in an inflammatory cell model of reverse cholesterol transport [J]. *Journal of Shandong University (Medical Edition)*, 2016, 54(11): 24-26.
- [8] 丁菲,姜洁.姜黄素对子宫内膜癌孕激素抵抗的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2021, 59(4): 35-41.
DING Fei, JIANG Jie. The impact of curcumin on hormone resistance in endometrial cancer [J]. *Journal of Shandong University (Medical Edition)*, 2021, 59(4): 35-41.
- [9] Sahebkar A, Cicero AFG, Simental-Mendía LE, et al. Curcumin downregulates human tumor necrosis factor- α levels: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 107: 234-242. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.026.
- [10] Son HE, Kim EJ, Jang WG. Curcumin induces osteoblast differentiation through mild-endoplasmic reticulum stress-mediated such as BMP2 on osteoblast cells [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 34-39. doi: 10.1016/j.lfs.2017.12.008.
- [11] Chen Z, Xue J, Shen T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(2): 329-338.
- [12] Riva A, Togni S, Giacomelli L, et al. Effects of a curcumin-based supplementation in asymptomatic subjects with low bone density: a preliminary 24-week supplement study[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(7): 1684-1689.
- [13] Molagoda IMN, Kang CH, Lee MH, et al. Fisetin promotes osteoblast differentiation and osteogenesis through GSK-3 β phosphorylation at Ser9 and consequent β -catenin activation, inhibiting osteoporosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 192: 114676. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114676.
- [14] Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [15] Kim KT, Lee YS, Han I. The role of epigenomics in osteoporosis and osteoporotic vertebral fracture [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): E9455.
- [16] Zhao H, Zhao N, Zheng P, et al. Prevention and treatment of osteoporosis using Chinese medicinal plants: special emphasis on mechanisms of immune modulation [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 6345857. doi: 10.1155/2018/6345857.
- [17] Li Y, Zhang T. Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications [J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(2): 197-205.
- [18] Peddada KV, Peddada KV, Shukla SK, et al. Role of curcumin in common musculoskeletal disorders: a review of current laboratory, translational, and clinical data [J]. *Orthop Surg*, 2015, 7(3): 222-231.
- [19] 熊艺璇,赵斌,贾凌璐,等.姜黄素通过 Nrf2 信号通路促进炎症状态下牙周膜干细胞的成骨分化[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2020, 58(5): 19-26.
XIONG Yixuan, ZHAO Bin, JIA Linglu, et al. Curcumin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells under inflammatory conditions through the Nrf2 signaling pathway [J]. *Journal of Shandong University (Medical Edition)*, 2020, 58(5): 19-26.
- [20] Saito K, Shinozuka T, Nakao A, et al. Synthesis and structure-activity relationship of 4-alkoxy-thieno[2,3-b]pyridine derivatives as potent alkaline phosphatase enhancers for osteoporosis treatment [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29(14): 1769-1773.
- [21] Opdebeeck B, D'Haese PC, Verhulst A. Inhibition of tissue non-specific alkaline phosphatase; a novel therapy against arterial media calcification? [J]. *J Pathol*, 2020, 250(3): 248-250.
- [22] Khorsand B, Elangovan S, Hong L, et al. A Comparative Study of the Bone Regenerative Effect of Chemically Modified RNA Encoding BMP-2 or BMP-9 [J]. *AAPS J*, 2017, 19(2): 438-446.
- [23] Rim EY, Clevers H, Nusse R. The wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators [J]. *Annu Rev Biochem*, 2022, 91: 571-598. doi: 10.1146/annurev-biochem-040320-103615.

- [24] Molagoda IMN, Kang CH, Lee MH, et al. Fisetin promotes osteoblast differentiation and osteogenesis through GSK-3 β phosphorylation at Ser9 and consequent β -catenin activation, inhibiting osteoporosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 192: 114676. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114676.
- [25] Turnham RE, Scott JD. Protein kinase a catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology [J]. *Gene*, 2016, 577(2): 101-108.
- [26] Dutta R, Tiu B, Sakamoto KM. CBP/p300 acetyltransferase activity in hematologic malignancies [J]. *Mol Genet Metab*, 2016, 119(1/2): 37-43.
- [27] Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, et al. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(19): 3850-3868.
- [28] Cheng X, Liu D, Ren X, et al. The β -catenin/CBP signaling axis participates in sepsis-induced inflammatory lung injury [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247(17): 1548-1557.
- [29] Ge L, Cui Y, Liu B, et al. ER α and Wnt/ β catenin signaling pathways are involved in angelicin-dependent promotion of osteogenesis [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 3469-3476.
- [30] Morgan RG, Ridsdale J, Payne M, et al. LEF-1 drives aberrant β -catenin nuclear localization in myeloid leukemia cells [J]. *Haematologica*, 2019, 104(7): 1365-1377.
- [31] Ni F, Zhang T, Xiao W, et al. IL-18-mediated SLC7A5 overexpression enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via the c-MYC pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 748831. doi: 10.3389/fcell.2021.748831.
- [32] Liu Z, Wu Y. Arctiin elevates osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by modulating cyclin D1 [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10866-10874.
- [33] Jeong JH, Choi JY. Interrelationship of Runx2 and estrogen pathway in skeletal tissues [J]. *BMB Rep*, 2011, 44(10): 613-618.
- [34] Zhang X, Yang M, Lin L, et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo [J]. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(3): 169-178.
- [35] Qiu WX, Ma XL, Lin X, et al. Deficiency of Macf1 in osterix expressing cells decreases bone formation by Bmp2/Smad/Runx2 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 317-327.
- [36] Ao Q, Wang SL, He Q, et al. Fibrin glue/fibronectin/heparin-based delivery system of BMP2 induces osteogenesis in MC3T3-E1 cells and bone formation in rat calvarial critical-sized defects [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(11): 13400-13410.
- [37] Aghali A. Craniofacial bone tissue engineering: current approaches and potential therapy [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2993.
- [38] Kan T, He Z, Du J, et al. Irisin promotes fracture healing by improving osteogenesis and angiogenesis [J]. *Orthop Translat*, 2022, 37: 37-45. doi: 10.1016/j.jot.2022.07.006
- [39] Hou ZY, Wang Z, Tao YX, et al. KLF2 regulates osteoblast differentiation by targeting of Runx2 [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(2): 271-280.
- [40] Martin V, Ribeiro IA, Alves MM, et al. Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocycline-nanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 101: 15-26. doi: 10.1016/j.msec.2019.03.056.
- [41] Lee WB, Wang CF, Lee JH, et al. Whitlockite granules on bone regeneration in defect of rat Calvaria [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3(11): 7762-7768.
- [42] Mohamad N, Nabih ES, Zakaria ZM, et al. Insight into the possible role of miR-214 in primary osteoporosis via osterix [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15518-15526.
- [43] Ghorbaninejad M, Khademi-Shirvan M, Hosseini S, et al. Effective role of Curcumin on expression regulation of EZH2 histone methyltransferase as a dynamic epigenetic factor in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2023, 1866(1): 194903.
- [44] Hu S, Huang Y, Chen Y, et al. Diosmetin reduces bone loss and osteoclastogenesis by regulating the expression of TRPV1 in osteoporosis rats [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(20): 1312.

(编辑:徐苗蓁)