

咖伦宾通过激活 Wnt 信号通路促进人颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化的研究

蒲红斌^{1,2}, 侯传东^{1,2}, 耿杰³, 何田田³, 张辉³, 吕忠霖², 李成辉^{1,2}, 沈柔慧⁴, 李鸿波⁵

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第二医学中心血液科, 北京 100853; ³山西医科大学管理学院, 山西太原 030604; ⁴湖北科技学院, 湖北咸宁 437199; ⁵解放军总医院第一医学中心口腔科, 北京 100853

摘要: **背景** 咖伦宾是从中药青牛胆中提取的一类二萜呋喃内酯型化合物, 具有多种生物学活性; 其对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响尚不清楚。**目的** 研究咖伦宾对人颌骨骨髓间充质干细胞(human jaw bone marrow mesenchymal stem cells, h-JBMMSCs)成骨分化的影响并初步探索其分子机制。**方法** 对提取的h-JBMMSCs进行流式细胞术及成骨、成脂向分化鉴定; 将h-JBMMSCs在不同浓度(0 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L)咖伦宾条件下进行成骨诱导。CCK-8实验检测咖伦宾对细胞增殖的影响; 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测、茜素红染色和钙离子半定量检测评估咖伦宾对h-JBMMSCs成骨分化的影响; Western blot和qPCR检测Runx2、Col1a1的mRNA及蛋白表达情况; 基于转录组数据的生物信息学分析和体外实验初步分析咖伦宾促进h-JBMMSCs成骨分化的分子机制。**结果** 咖伦宾浓度≤20 μmol/L时, 对h-JBMMSCs的增殖能力无抑制作用($P < 0.05$)。与0 μmol/L组比较, 5 μmol/L组成骨诱导后ALP活性升高($P < 0.01$); 20 μmol/L组成骨诱导后茜素红染色面积和钙结节密度升高($P < 0.001$)。咖伦宾成骨诱导后, 成骨相关基因与蛋白Runx2、Col1a1表达量增加($P < 0.05$)。富集分析结果显示, 差异表达基因在细胞外基质受体相互作用和P53信号通路等方面显著富集, 进一步分析箱线图及体外实验发现咖伦宾诱导成骨后Wnt信号通路主要下游效应体β-catenin的mRNA和蛋白表达量增加。**结论** 咖伦宾浓度≤20 μmol/L时, 对h-JBMMSCs的成骨向分化具有一定的促进作用, 可能是通过激活Wnt信号通路得以实现的。

关键词: 咖伦宾; 骨质疏松症; 间充质干细胞; 细胞分化; Wnt信号通路

中图分类号: R318.17; R781.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)04-0369-08

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25010102

引用本文: 蒲红斌, 侯传东, 耿杰, 等. 咖伦宾通过激活 Wnt 信号通路促进人颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (4): 369-376.

Columbin promotes osteogenic differentiation of human jaw bone marrow mesenchymal stem cells by activating Wnt signaling pathway

PU Hongbin^{1,2}, HOU Chuandong^{1,2}, GENG Jie³, HE Tiantian³, ZHANG Hui³, LYU Zhonglin², LI Chenghui^{1,2}, SHEN Rouhui⁴, LI Hongbo⁵

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Hematology, the Second Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³School of Management, Shanxi Medical University, Taiyuan 030604, Shanxi Province, China; ⁴Hubei University of Science and Technology, Xianning 437199, Hubei Province, China; ⁵Department of Stomatology, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LI Hongbo. Email: hongbolii@sina.com

Abstract: Background Columbin, a diterpenoid furanolactone-type compound isolated from the traditional Chinese herb *Tinospora sagittate*, exhibits diverse biological activities, and the effects of columbin on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells remain elusive. **Objective** To study the effect of columbin on osteogenic differentiation of human jaw bone marrow mesenchymal stem cells and explore its molecular mechanism. **Methods** The extracted h-JBMMSCs were identified by flow cytometry and osteogenic and lipogenic differentiation; h-JBMMSCs were subjected to osteogenic induction in the presence of columbin at concentrations of 0, 5, 10, 20, 40, and 80 μmol/L. The effect of columbin on cell proliferation was detected by CCK-8 assay; ALP activity assay, alizarin red staining and calcium ion semi-quantitative assay were used to evaluate the effect of columbin on osteogenic differentiation of h-JBMMSCs; The expression of Runx2, Col1a1 proteins and mRNA were detected by Western blotting and q-PCR; Bioinformatic analysis of transcriptome data and in vitro experiments were conducted to

收稿日期: 2025-01-01

第一作者: 蒲红斌, 在读硕士。Email: puhongbin88688@163.com

通信作者: 李鸿波, 博士, 主任医师, 教授。Email: hongbolii@sina.com

investigate the molecular mechanism of columbin in promoting osteogenic differentiation of h-JBMMSCs. **Results** Columbin exhibited no inhibitory effect on the proliferation capacity of h-JBMMSCs with concentration less or equal to 20 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group, the ALP activity was increased in the 5 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.01$). The alizarin red staining area and the density of calcium nodules increased in 20 $\mu\text{mol/L}$ columbin group ($P < 0.001$). The expressions of osteogenesis-related genes and proteins Runx2 and Col1a1 were increased after the osteogenic induction of columbin ($P < 0.05$). The results of enrichment analysis showed that differentially expressed genes were significantly enriched in ECM receptor interaction and P53 signaling pathway, further analysis of box plots and in vitro experiments showed that the mRNA and protein expression of β -catenin, the main downstream effector of Wnt signaling pathway, significantly increased after columbin-induced osteogenesis. **Conclusion** Columbin with concentration less or equal to 20 $\mu\text{mol/L}$ exerts a promotive effect on the osteogenic differentiation of h-JBMMSCs, and this process may involve the activation of the Wnt signaling pathway.

Keywords: columbin; osteoporosis; mesenchymal stem cells; cell differentiation; Wnt signaling pathway

Cited as: Pu HB, Hou CHD, Geng J, et al. Columbin promotes osteogenic differentiation of human jaw bone marrow mesenchymal stem cells by activating Wnt signaling pathway[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(4): 369-376.

骨质疏松症是一种以低骨量和骨结构破坏为特征的全身代谢性骨病, 易导致骨脆性增加、病理性骨折增多^[1-2]。间充质干细胞来源的成骨细胞与破骨细胞之间的功能失衡是骨质疏松症形成的主要原因^[3]。人颌骨骨髓间充质干细胞(human jaw bone marrow mesenchymal stem cells, h-JBMMSCs)是源于人颌骨骨髓的一类具有高增殖、高迁移活性和多向分化潜力的成体干细胞^[4]。h-JBMMSCs增殖率高, 成骨潜力强, 是治疗骨质疏松症的理想种子细胞。促进h-JBMMSCs成骨向分化以增加骨形成可能是治疗骨质疏松症的一种有效方法^[5]。

青牛胆作为一种传统中药, 有治疗骨质疏松症的功效^[6]。伽伦宾是一种二萜呋喃内酯型化合物, 为青牛胆中的一种主要活性成分。既往研究表明, 伽伦宾有抗炎、镇痛、降血脂及抗肿瘤等作用^[7]。伽伦宾对h-JBMMSCs成骨分化的影响尚不清楚。本研究验证伽伦宾对h-JBMMSCs增殖及成骨分化的影响, 并进一步探讨相关信号通路等分子机制, 以期伽伦宾应用于治疗骨质疏松症提供一定科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

h-JBMMSCs完全培养基[L-DMEM(Gibco)+10%胎牛血清(Gibco)+1%青链霉素(Gibco)]; 成骨诱导培养基[L-DMEM(Gibco)+10%胎牛血清(Gibco)+1%青链霉素(Gibco)+10 mmol/L β -甘油磷酸钠(MCE)+50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸(MCE)+10 nmol/L 地塞米松(Sigma)]; 成脂诱导分化培养基、油红O染色液(武汉普诺赛); 茜素红染色液(广州赛业); CCK-8试剂盒(同仁化学); 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(碧云天); 氯化十六烷基吡啶(阿拉丁); 伽伦宾(阿拉丁, 货号:

C414348, 规格: 5 mg, 纯度: $\geq 98\%$); 抗OPN抗体、抗Runx2抗体、抗Col1a1抗体(AB clonal)、抗 β -catenin抗体(武汉三鹰); 细胞裂解液相关试剂PMSF、RIPA裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂A、蛋白磷酸酶抑制剂B、50 \times Cocktail(北京索莱宝); 逆转录试剂盒、SYBR qPCR Master Mix试剂盒(诺唯赞); NanoDrop One核酸定量检测仪、CO₂恒温孵箱(Thermo); 实时定量PCR仪(Bio-Rad)。

1.2 h-JBMMSCs的分离、培养和鉴定

因正颌手术需要而切除的下颌松质骨碎片标本取自解放军总医院第一医学中心口腔科, 标本来源于无系统性疾病的青年女性且已取得患者知情同意, 标本大小约4 mm \times 4 mm \times 4 mm。采用全骨髓贴壁法提取h-JBMMSCs, 用完全培养基反复冲洗骨碎片, 将骨髓冲洗液及骨碎片全部接种于10 cm培养皿中, 将培养皿放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂细胞培养箱中进行培养。之后每3 d更换1次完全培养基, 光学显微镜下观察细胞形态, 待细胞融合度达到80%~90%时按1:3比例传代, 取P3~P4代细胞用于后续实验。取P3代细胞进行流式细胞表面标志物鉴定以及成骨、成脂多向分化诱导鉴定。

1.3 CCK-8检测细胞增殖能力

取P4代细胞以 3×10^3 /孔的密度接种于96孔板, 每组设置6个复孔, 在培养箱中培养24 h使其贴壁。伽伦宾溶解于DMSO中, 配制成浓度为10 mmol/L的母液, 在成骨诱导培养基中加入伽伦宾母液以配制成终浓度为0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。将工作液加入培养的细胞中, 分别培养24 h、48 h、72 h后, 每孔加入10 μL 的CCK-8试剂, 于培养箱中继续培养2 h, 使用酶标仪检测450 nm波长处各孔的OD值。

1.4 ALP检测试剂盒检测细胞成骨能力

采用ALP检测试剂盒检测h-JBMMSCs成骨诱导7 d后ALP的活性。取P4代细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于12孔板,细胞融合度达到80%时更换为不同浓度咖伦宾的工作液,每3 d换液1次。培养7 d后PBS清洗3次,使用Western blot及IP细胞裂解液裂解细胞,4°C下12 000 r/min离心15 min,取上清于405 nm波长处检测各组的OD值。

1.5 茜素红染色检测细胞成骨能力

采用茜素红染色评估成骨诱导14 d后的钙沉积情况。P4代细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于12孔板,细胞融合度达80%时更换为不同浓度咖伦宾的工作液,每3 d换液1次。连续培养14 d,去上清,PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定30 min后,使用茜素红染液进行染色,室温下孵育30 min。PBS轻柔清洗3次后拍照观察,并加入10%氯化十六烷基吡啶,室温下孵育1 h。使用酶标仪在562 nm波长处检测各组的OD值。

1.6 油红O染色检测细胞成脂能力

采用油红O染色评估成脂诱导21 d后的成脂分化情况。P4代细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于6孔板,细胞融合度达到100%时更换为成脂诱导培养基,每3 d换液1次。成脂诱导21 d后,按照油红O试剂盒说明书的步骤进行油红O染色,并在光学显微镜下观察脂滴形成情况。

1.7 qPCR检测成骨相关基因表达情况

P4代细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于10 cm培养皿,细胞融合度达80%时更换为不同浓度咖伦宾的工作液,每3 d换液1次。分别培养7 d和14 d后,使用Trizol法提取各组细胞总RNA,并测定浓度与纯度。按照说明书的步骤,使用逆转录试剂盒逆转录成cDNA。采用SYBR qPCR Master Mix试剂盒进行定量检测成骨相关基因的表达情况。GAPDH作管家基因,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算结果。反应体系为20 μ L,扩增程序:95°C预变性10 s;95°C退火10 s,60°C延伸30 s,共40个循环。相关引物由博迈德公司合成,引物序列见表1。

1.8 Western blot检测成骨相关蛋白表达

P4代细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于10 cm培养皿,细胞融合度达80%时更换为不同浓度咖伦宾的工作液,每3 d换液1次。分别培养7 d和14 d后,收集细胞沉淀,加入细胞裂解液4°C摇床裂解15 min后,4°C下12 000 r/min离心30 min,收集上清即为总蛋白。向蛋白中加入 $5 \times$ 上样缓冲液后煮

表1 成骨相关基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of osteogenesis-related genes

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R:TGGTGAAGACGCCAGTGGA
Runx2	F:TGGTTACTGTTCATGGCGGGTA R:TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA
Coll1a1	F:GCCAAGACGAAGACATCCCA R:GGCAGTTCTTGGTCTCGTCA
β -catenin	F:CATCTACACAGTTTGTATGCTGCT R:GCAGTTTTGTGAGTTCAGGGA

沸8 min,使蛋白质变性。10% SDS-PAGE凝胶电泳后转膜、封闭,4°C下与一抗Runx2、Coll1a1、 β -catenin和 β -actin孵育过夜,次日洗膜后室温二抗孵育2 h。通过ECL显色试剂盒显色,Image J软件对条带进行灰度值分析。

1.9 成骨诱导后的转录组测序与通路富集分析

P4代细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于10 cm培养皿,对照组使用完全培养基进行培养,实验组使用含有咖伦宾的工作液进行培养。相同条件下培养14 d后提取各组RNA,每组设置3个生物学重复。由擎科生物Illumina平台对样本进行转录组测序。以 $P_{adj} < 0.05$ 、 $|\log FC| > 1$ 为阈值,使用R语言DESeq2包筛选两组间差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)^[8]。采用clusterProfiler包进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,并将结果可视化。

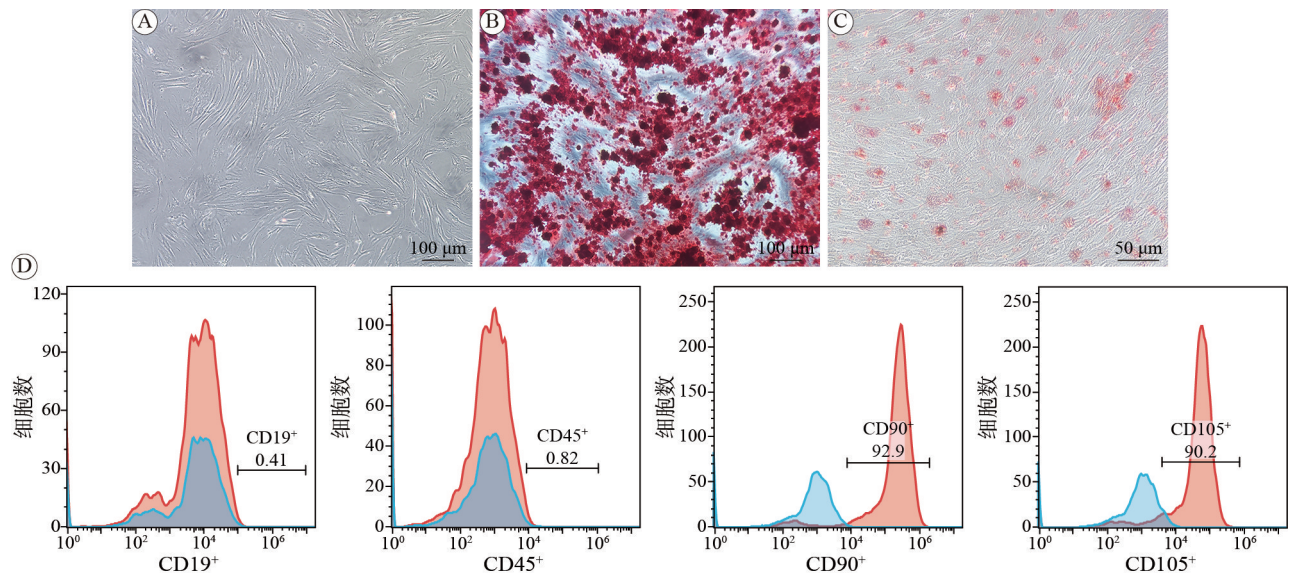
1.10 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.4.0进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组采用正态性检验,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 h-JBMMSCs的细胞形态、表面标志物及多向分化能力鉴定

原代细胞在完全培养基中培养,光镜下观察P3代h-JBMMSCs呈旋涡状、聚集样贴壁生长。流式细胞术结果显示细胞表面标志物CD90(92.9%)、CD105(90.2%)表达呈阳性,CD19(0.41%)和CD45(0.82%)表达呈阴性。成骨诱导14 d茜素红染色,光镜下可见大量红色矿化结节。成脂诱导21 d油红O染色,光镜下可见脂滴形成。表明分离的细胞符合间充质干细胞特性(图1)。



A: 光镜下P3代细胞形态(40×); B: 成骨诱导14 d茜素红染色(40×); C: 成脂诱导21 d油红O染色(100×); D: 流式细胞术鉴定细胞表面标志物。

图1 人颌骨骨髓间充质干细胞培养与鉴定

Fig. 1 Culture and identification of human jaw bone marrow mesenchymal stem cells

2.2 不同浓度咖伦宾对h-JBMMSCs增殖的影响

以0 $\mu\text{mol/L}$ 咖伦宾组作为对照组, 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 组作为实验组进行CCK-8实验, 结果显示, 与对照组比较, 在5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 组中均未观察到抑制增殖的作用, 且20 $\mu\text{mol/L}$ 组在作用24 h和48 h时对细胞增殖表现出促进作用($P < 0.05$), 但随着时间的延长, 72 h时对细胞的增殖不再具有促进作用。在40 $\mu\text{mol/L}$ 组中, 48 h时可观察到促进增殖的作用, 然而在72 h时, 对细胞的增殖则表现出一定的抑制作用。80 $\mu\text{mol/L}$ 咖伦宾组则始终抑制细胞的增殖(图2)。结果表明, 低浓度的咖伦宾对h-JBMMSCs无细胞毒性作用, 因此选择5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验

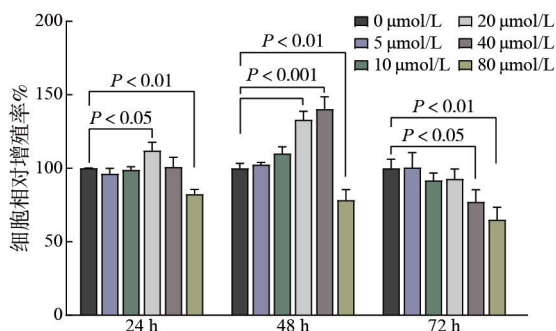


图2 h-JBMMSCs与不同浓度(0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)咖伦宾共培养24 h、48 h和72 h后使用CCK-8检测细胞增殖

Fig. 2 h-JBMMSCs were co-cultured with different concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$) of columbin for 24, 48 and 72 hours, and cell proliferation was detected by CCK-8

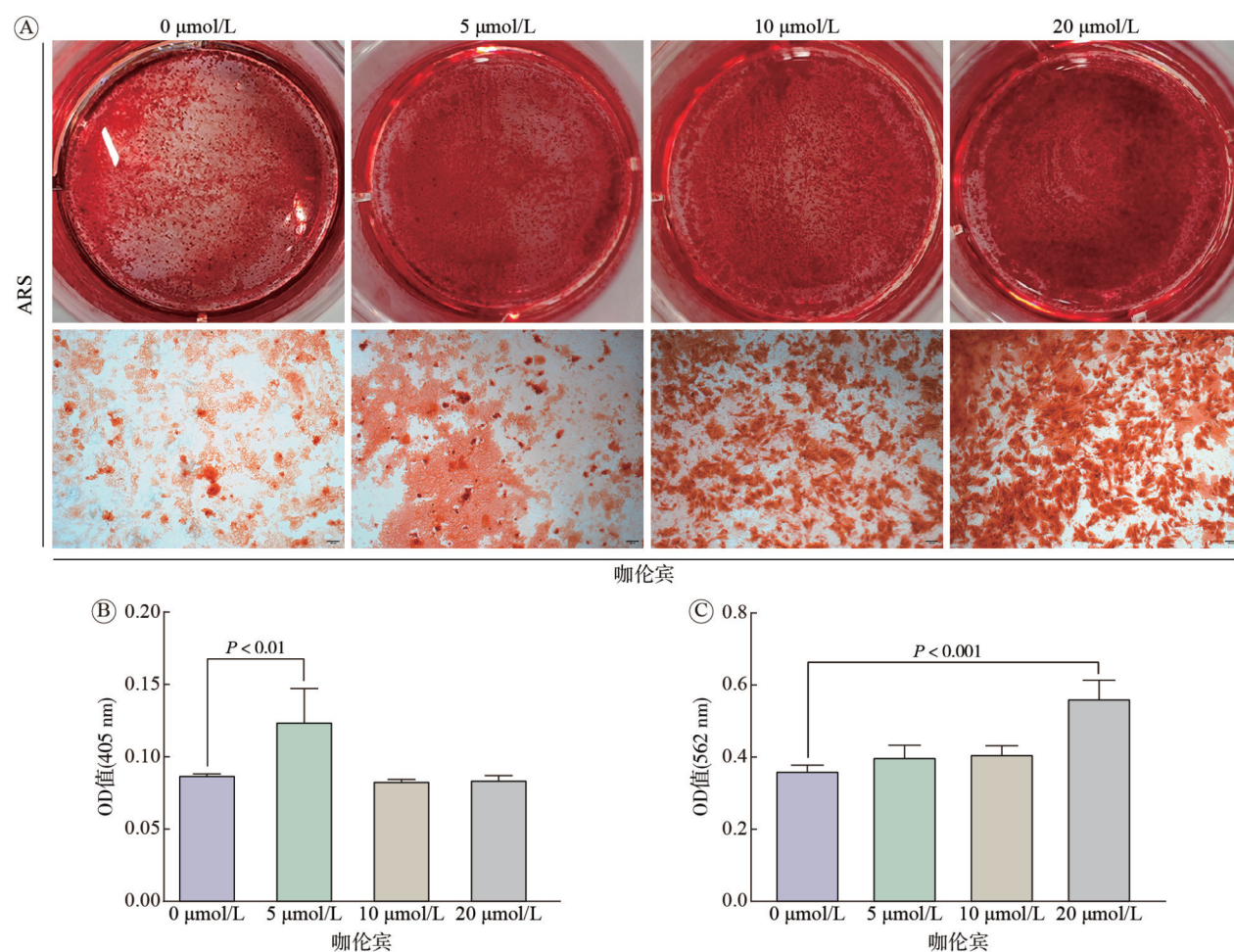
组进行后续实验。

2.3 咖伦宾对h-JBMMSCs成骨分化的影响

以0 $\mu\text{mol/L}$ 咖伦宾组作为对照组, 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 组作为实验组对h-JBMMSCs进行成骨诱导7 d和14 d时分别进行ALP活性检测及茜素红染色。ALP检测结果显示, 在5 $\mu\text{mol/L}$ 时提高了ALP的活性($P < 0.01$), 在10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 时未观察到显著的变化(图3B)。茜素红染色结果显示, 随着咖伦宾浓度的增加, 红染面积和钙离子浓度逐渐增加, 其中咖伦宾浓度在20 $\mu\text{mol/L}$ 时效果最显著(图3A)。半定量分析结果同样表明, 细胞在20 $\mu\text{mol/L}$ 咖伦宾条件下孵育时钙离子沉积量高于对照组($P < 0.001$) (图3C)。进一步qPCR结果表明, 咖伦宾成骨诱导7 d和14 d时h-JBMMSCs中Runx2和Colla1的表达水平高于对照组(图4)。Western blot结果显示, 在诱导培养7 d时, Runx2蛋白表达量随着咖伦宾作用浓度的升高而升高, Colla1蛋白表达量亦高于对照组。在诱导培养14 d时, Runx2和Colla1的表达量均升高, 并呈浓度依赖性(图5)。

2.4 转录组测序数据结果分析

20 $\mu\text{mol/L}$ 咖伦宾组可增强h-JBMMSCs成骨分化晚期阶段的成骨能力, 因此实验组选择咖伦宾浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液作为诱导因素来进行转录组分析。共筛选出2 087个DEGs, 使用ggplot2软件包作DEGs火山图(图6), 其中上调基因896



A: 咖伦宾成骨培养 14 d 茜素红染色大体观与镜下观(40 ×); B: ALP 活性检测; C: 钙结节半定量分析。

图 3 h-JBMMSCs 与不同浓度(0、5、10、20 μmol/L)咖伦宾共培养 7 d 后进行 ALP 活性检测以及共培养 14 d 后进行茜素红染色和钙结节半定量分析

Fig. 3 h-JBMMSCs were co-cultured with different concentrations (0, 5, 10, and 20 μmol/L) of columbin for 7 days, and alizarin red staining and semi-quantitative analysis of calcium nodules were performed after 14 days

个, 下调基因 1 191 个。GO 富集分析结果显示, 生物学进程主要与核分裂、染色体分离等相关; 细胞组分主要与细胞外基质胶原蛋白等相关; 分子功能主要与细胞外基质和胶原结合等相关(图 7A)。KEGG 通路富集分析结果显示主要与细胞周期、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)受体相互作用和 P53 信号通路等相关(图 7B)。Wnt/ β -catenin 信号通路在间充质干细胞成骨分化过程中发挥关键作用^[9]。为进一步探索 Wnt/ β -catenin 信号通路在咖伦宾诱导成骨过程中的作用, 使用 ggplot2 软件包对 DEGs 进行箱线图绘制, 发现 Wnt/ β -catenin 通路的关键分子 β -catenin 基因表达水平高于对照组(图 8A), 这也与 qPCR 和 Western blot 实验中 β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达结果一致(图 8B ~ 图 8D)。进一步从 PDB、TCMSP 数据库中下载 β -catenin 和咖伦宾的蛋白质结构, 利用

AutoDockTools 软件进行分子对接并使用 Pymol 软件进行可视化(图 9), 咖伦宾与 β -catenin 通过 2 个氢键相结合, 结合能为 -7.3 kJ/mol, 提示两者之间具有较强的结合能力。

3 讨论

由于人口老龄化的加剧, 骨质疏松症日益成为重要的健康问题。在骨质疏松症的发生发展中, 成骨细胞介导的骨形成作用弱于破骨细胞介导的骨吸收作用, 因此促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化对于恢复骨量、治疗骨质疏松症具有重要意义^[10]。中药青牛胆具有增加骨质疏松大鼠的骨密度、促进成骨细胞生成的作用。咖伦宾作为青牛胆的主要活性成分, 已被发现在多个生物学进程中发挥作用, 如 Libin 等^[11]通过分子对接模型及体外实验发现咖伦宾可与 H1N1 病毒蛋白进行

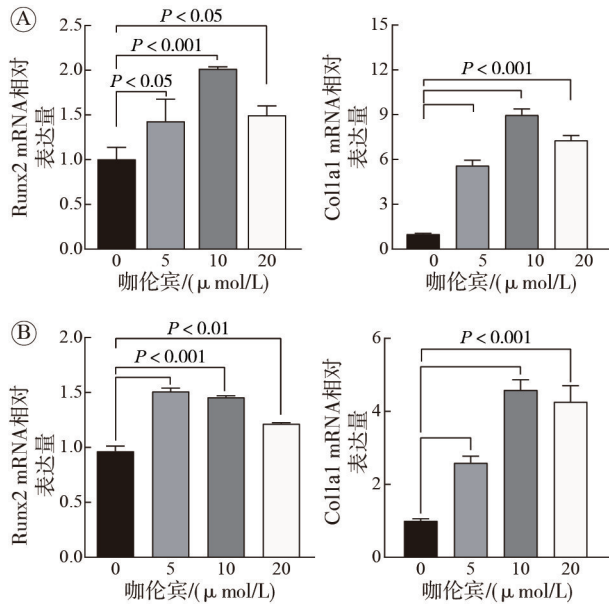
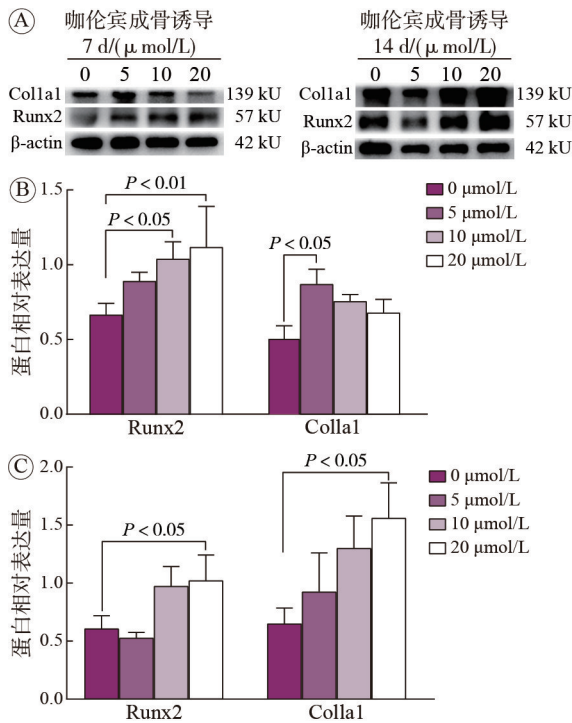


图4 qPCR检测不同浓度(0、5、10、20 μmol/L)咖伦宾成骨培养7 d(A)和14 d(B)的h-JBMMSCs中成骨相关基因表达

Fig. 4 qPCR was used to detect the expression of osteogenesis-related genes in h-JBMMSCs cultured with different concentrations (0, 5, 10, 20 μmol/L) of columbin for 7 days (A) and 14 days (B)



A: Western blot显示成骨诱导7 d和14 d时Runx2、Colla1、β-actin条带情况; B: 成骨诱导7 d后Runx2、Colla1蛋白相对表达情况; C: 成骨诱导14 d后Runx2、Colla1蛋白相对表达情况。

图5 Western blot检测不同浓度(0、5、10、20 μmol/L)咖伦宾成骨培养7 d和14 d的h-JBMMSCs中成骨相关蛋白表达

Fig. 5 Western blotting was used to detect the expression of osteogenesis-related proteins in h-JBMMSCs cultured with different concentrations (0, 5, 10, 20 μmol/L) of columbin for 7 days and 14 days

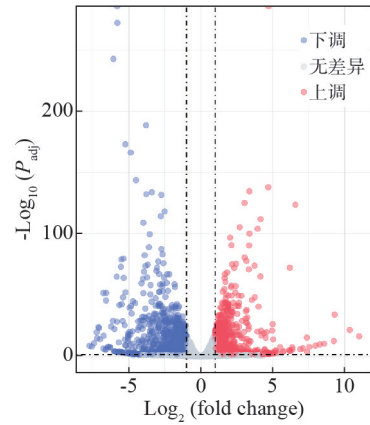


图6 h-JBMMSCs在0 μmol/L和20 μmol/L咖伦宾条件下培养14 d的转录组差异表达基因火山图分析

Fig. 6 Volcano plot analysis of differentially expressed genes in transcriptome of h-JBMMSCs cultured under 0 μmol/L and 20 μmol/L columbin for 14 days

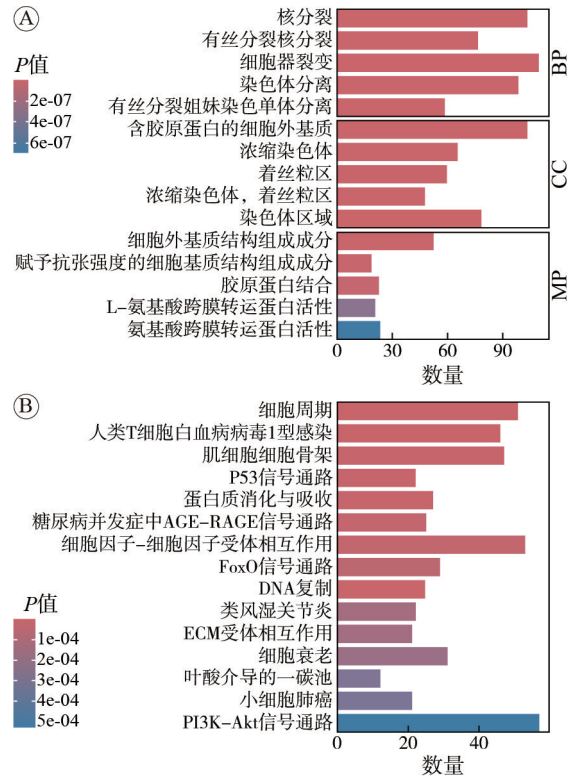
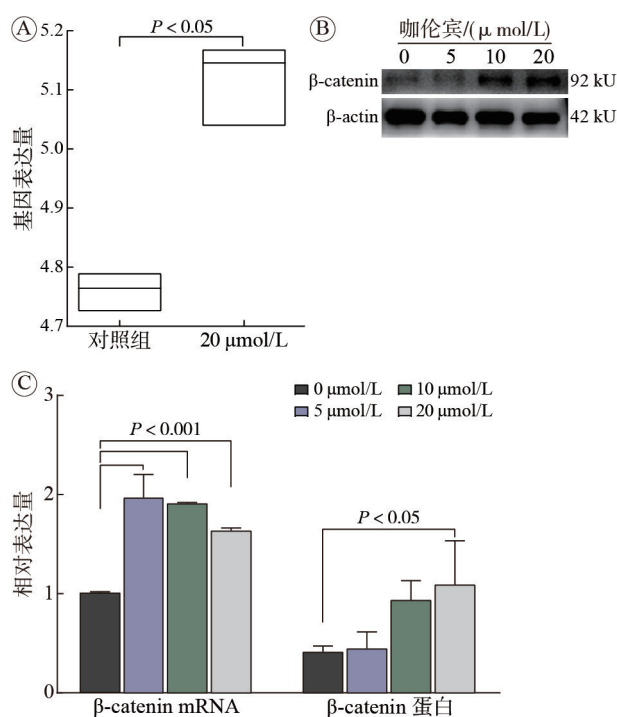


图7 h-JBMMSCs在0 μmol/L和20 μmol/L咖伦宾条件下培养14 d的转录组差异表达基因的GO功能(A)和KEGG通路(B)富集分析

Fig. 7 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of differentially expressed genes in the transcriptome of h-JBMMSCs cultured under 0 and 20 μmol/L columbin for 14 days

稳固的结合, 可作为H1N1流感的潜在抗病毒剂。还有大量文献报道咖伦宾在体内和体外均具有显著的抗炎效果, 可作为一种潜在的抗炎药。而炎症可抑制成骨细胞的分化, 并引起成骨细胞的功能障碍, 从而在骨质疏松症的发展中发挥作用^[12]。咖伦宾可能通过抗炎作用来减轻炎症对成骨细胞



A: β -catenin 箱线图结果; B: Western blot 显示 β -catenin 和 β -actin 条带情况; C: β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达水平。

图 8 测序结果中 β -catenin 箱线图以及 h-JBMSCs 与不同浓度 (0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 咖伦宾共培养 14 d 后 β -catenin 的蛋白和 mRNA 表达水平

Fig. 8 The box plot of β -catenin in the sequencing results and the expression levels of β -catenin protein and mRNA in h-JBMSCs co-cultured with different concentrations (0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) of columbin for 14 days

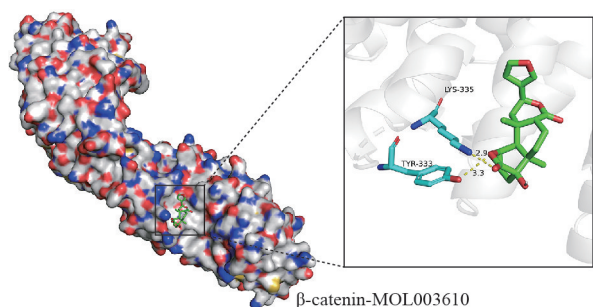


图 9 咖伦宾与 β -catenin 分子对接结果

Fig. 9 Results of molecular docking between columbin and β -catenin

分化的抑制作用。但目前无咖伦宾对 h-JBMSCs 成骨分化影响的研究报道。本研究中通过体外实验探索咖伦宾对 h-JBMSCs 增殖和成骨分化的影响以及可能的调控机制。

通过研究不同浓度咖伦宾对 h-JBMSCs 增殖的影响, 我们发现咖伦宾浓度 $\leq 20 \mu\text{mol/L}$ 时对 h-JBMSCs 的增殖无显著抑制作用; 而咖伦宾 $> 20 \mu\text{mol/L}$ 时, 随着作用时间的延长而表现出一定

的增殖抑制作用。因此选择 $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 组作为实验组进一步评估 ALP 活性、钙离子沉积以及成骨相关基因和蛋白质的表达, 观察到咖伦宾可以显著促进 h-JBMSCs 的成骨分化。然而 ALP 活性检测和茜素红染色的结果具有一定差异性, 这种差异可能是由于不同浓度的咖伦宾作用于不同的信号通路所致, $5 \mu\text{mol/L}$ 时对 h-JBMSCs 的早期分化通路有更显著的激活作用, 而 $20 \mu\text{mol/L}$ 时则可能在晚期对矿化相关的过程产生更强的影响, 更体现出成骨分化相关调控机制的复杂性。Runx2 作为成骨早期阶段的核心转录因子, 可通过调控多种骨特异性转录因子来诱导成骨分化, 而 Col1a1 在骨组织中含量丰富, 被认为是成骨分化晚期的标志之一^[13-14]。在本研究中, 咖伦宾作用于 h-JBMSCs 14 d 后显著上调了 Runx2 和 Col1a1 基因和蛋白质表达水平, 表明咖伦宾在成骨分化早期和晚期均发挥着促进作用, 显示出其具有治疗骨质疏松症的强大潜力。

由于 $20 \mu\text{mol/L}$ 咖伦宾在成骨分化晚期阶段发挥着显著促进作用, 我们选择 $20 \mu\text{mol/L}$ 咖伦宾成骨诱导 14 d 后进行转录组测序分析。通过对转录组数据进行通路富集分析, 发现 DEGs 在 ECM 受体相互作用和 P53 信号通路等方面显著富集。ECM 作为细胞的物理支持成分, 其结构和功能复杂, 在促进细胞迁移、细胞周期进程和决定细胞命运方面至关重要, 既往研究发现 ECM 可通过 Wnt 信号通路促进矿化形成^[15]。P53 是细胞分化的重要调节因子, Zhou 等^[16]通过 β -catenin 条件性谱系示踪小鼠发现 P53 在 Wnt 通路介导的成骨向分化中起负向调节作用, P53 缺陷的骨髓间充质干细胞成骨分化能力更强。Wnt 信号通路作为调控间充质干细胞成骨分化的关键通路之一, 包括依赖 β -catenin 的经典信号通路和不依赖 β -catenin 的非经典信号通路, 经典信号通路对于间充质干细胞成骨分化的调控作用尤为重要, 该通路的激活可显著增强间充质干细胞的成骨分化^[17-19]。其中 β -catenin 作为经典信号通路的主要下游效应体, 在本研究中, 咖伦宾可通过与 β -catenin 形成稳定的结合体, 在咖伦宾成骨诱导培养 14 d 后 β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达水平提高, 提示咖伦宾可能是通过 Wnt 信号通路尤其是其中的经典信号通路促进 h-JBMSCs 成骨向分化, 这也与通路富集的结果契合。但 Wnt 信号通路是一个极其复杂的作用网络, 其具体调控机制还需进一步研究。

综上所述, 本研究发现咖伦宾浓度 $\leq 20 \mu\text{mol/L}$ 时可促进h-JBMMSCs成骨向分化, 并且这一过程可能是通过激活Wnt信号通路尤其是经典信号通路实现的; 提示咖伦宾可能是一种治疗骨质疏松症的潜在药物, 未来需进一步研究咖伦宾的详细作用机制以及咖伦宾在体内的作用效果。

作者贡献 蒲红斌: 实验实施, 数据分析处理, 论文撰写; 侯传东、耿杰、何田田、张辉: 实验指导, 论文修改; 吕忠霖、李成辉、沈柔慧: 数据分析, 论文修改; 李鸿波: 审读, 论文修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: puhongbin88688@163.com。

参考文献

- Johnston CB, Dagar M. Osteoporosis in older adults [J]. *Med Clin N Am*, 2020, 104 (5): 873-884.
- Li B, Wang Y, Gong SQ, et al. Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154198.
- Kim M, Park M. The brown algae *Ishige sinicola* extract ameliorates ovariectomy-induced bone loss in rats and suppresses osteoclastogenesis through downregulation of NFATc1/c-fos [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (9): 1683.
- Wang YD, Gao Y, Wang Y, et al. GDNF promotes the proliferation and osteogenic differentiation of jaw bone marrow mesenchymal stem cells via the Nr4a1/PI3K/Akt pathway [J]. *Cell Signal*, 2023, 108: 110721.
- Jin YC, Hong FL, Bao QY, et al. MicroRNA-145 suppresses osteogenic differentiation of human jaw bone marrow mesenchymal stem cells partially via targeting semaphorin 3A [J]. *Connect Tissue Res*, 2020, 61 (6): 577-585.
- 张慧, 雷钦钰, 刘旭阳, 等. 青牛胆属药用植物药理作用研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2023, 19 (4): 242-246.
- Liao YF, Wang X, Ran GY, et al. DNA damage and up-regulation of PARP-1 induced by columbin in vitro and in vivo [J]. *Toxicol Lett*, 2023, 379: 20-34.
- Xu JS, Liao KL, Fu ZH, et al. Screening differentially expressed genes of pancreatic cancer between Mongolian and Han people using bioinformatics technology [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20 (1): 298.
- 杨琳, 段霏, 李朋礼, 等. 去泛素化酶调控骨改建相关信号通路的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2024, 45 (8): 898-903.
- Zheng S, Zhou CH, Yang H, et al. Melatonin accelerates osteoporotic bone defect repair by promoting osteogenesis-angiogenesis coupling [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 826660.
- Libin KV, Debnath M, Sisodiya S, et al. Bioefficacy, chromatographic profiling and drug-likeness analysis of flavonoids and terpenoids as potential inhibitors of H1N1 influenza viral proteins [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 281 (Pt 1): 136125.
- Zhivodernikov IV, Kirichenko TV, Markina YV, et al. Molecular and cellular mechanisms of osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (21): 15772.
- Ran GY, Fang W, Zhang LF, et al. Polypeptides IGF-1C and P24 synergistically promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro through the p38 and JNK signaling pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 141: 106091.
- Deng Y, Guo T, Li JP, et al. Repair of calvarial bone defect using Jarid1a-knockdown bone mesenchymal stem cells in rats [J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24 (9/10): 711-718.
- Kornsuthisophon C, Nowwarote N, Chansaenroj A, et al. Human dental pulp stem cells derived extracellular matrix promotes mineralization via Hippo and Wnt pathways [J]. *Sci Rep*, 2024, 14 (1): 6777.
- Zhou X, Beilter A, Xu ZH, et al. Wnt/ β -catenin-mediated p53 suppression is indispensable for osteogenesis of mesenchymal progenitor cells [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (6): 521.
- 闫小龙, 秦英, 邵将, 等. 姜黄素通过Wnt/ β -catenin信号通路调控骨形成的机制 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2024, 62 (10): 76-86.
- Han H, Tian TY, Huang GQ, et al. The lncRNA H19/miR-541-3p/Wnt/ β -catenin axis plays a vital role in melatonin-mediated osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13 (14): 18257-18273.
- Zhang Z, Jiang WW, Hu M, et al. MiR-486-3p promotes osteogenic differentiation of BMSC by targeting CTNBP1 and activating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 566: 59-66.

(责任编辑: 孟晓彤)