

# 基于 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路探究金天格胶囊对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 干预下前成骨细胞生物学功能的影响

刘丹<sup>1</sup> 黄思柔<sup>2</sup> 刘璞<sup>1</sup> 李娟<sup>3</sup> 陈琳<sup>4△</sup>

**[摘要]** 目的:探讨基于 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(Wnt/ $\beta$ -catenin)信号通路对金天格胶囊在肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )干预下前成骨细胞生物学功能的影响。方法:取第 4 代 MC3T3-E1 细胞,将细胞分为正常组、TNF- $\alpha$  组(TNF- $\alpha$  15 ng/mL)、TNF- $\alpha$ +10  $\mu$ g/mL 金天格组(TNF- $\alpha$  15 ng/mL+10  $\mu$ g/mL 金天格胶囊)、TNF- $\alpha$ +20  $\mu$ g/mL 金天格组(TNF- $\alpha$  15 ng/mL+20  $\mu$ g/mL 金天格胶囊)、TNF- $\alpha$ +40  $\mu$ g/mL 金天格组(TNF- $\alpha$  15 ng/mL+40  $\mu$ g/mL 金天格胶囊)、Dickkopf 相关蛋白 1(DKK1)组(TNF- $\alpha$  15 ng/mL+40  $\mu$ g/mL 金天格胶囊+0.1  $\mu$ g/mL Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制剂 DKK1)、40  $\mu$ g/mL 金天格组(40  $\mu$ g/mL 金天格胶囊),各组细胞均使用相应药物共培养 24 h。CCK8 法检测细胞增殖;流式细胞术检测细胞凋亡;ELISA 法检测细胞上清白介素-6(IL-6)、IL-1 $\beta$ 、IL-10 水平;ALP 试剂盒法检测细胞 ALP 活性;茜素红染色观察细胞矿化分化情况;qRT-PCR 法和 Western-Blot 法检测细胞  $\beta$ -catenin、糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )、Runt 相关转录因子 2(RUNX2)、核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)表达情况。结果:与正常组相比,TNF- $\alpha$  组细胞存活率、ALP 活性、相对吸光度值、钙结节数量、上清 IL-10 水平、p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、OPG 表达显著下降,细胞凋亡率、上清 IL-6、IL-1 $\beta$  水平、RANKL 表达升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );40  $\mu$ g/mL 金天格组细胞存活率、ALP 活性、相对吸光度值、钙结节数量、p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、OPG 表达升高,细胞凋亡率、RANKL 表达降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组相比,TNF- $\alpha$ +10  $\mu$ g/mL 金天格组、TNF- $\alpha$ +20  $\mu$ g/mL 金天格组、TNF- $\alpha$ +40  $\mu$ g/mL 金天格组细胞存活率、ALP 活性、相对吸光度值、钙结节数量、上清 IL-10 水平、p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、OPG 表达显著升高,细胞凋亡率、上清 IL-6、IL-1 $\beta$  水平、RANKL 表达下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制剂 DKK1 逆转了金天格胶囊对 TNF- $\alpha$  刺激的前成骨细胞促增值和分化作用,并增加细胞凋亡和炎症反应。结论:金天格胶囊可通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 TNF- $\alpha$  诱导的前成骨细胞的凋亡和炎症,促进细胞增殖和分化。

**[关键词]** Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路;金天格胶囊;前成骨细胞;生物学功能

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)06-0001-07

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.230601

## Efficacy of Jintiang on the Biological Function of Preosteoblasts under Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Intervention Based on Wnt/ $\beta$ -catenin Signal Pathway

LIU Dan<sup>1</sup> HUANG Sirou<sup>2</sup> LIU Pu<sup>1</sup> LI Juan<sup>3</sup> CHEN Lin<sup>4△</sup>

基金项目:西安医学院第一附属医院横向基金项目(HX-2022-01)

陕西省自然科学基金研究计划项目(2021JZ-59)

陕西省重点研发计划项目(2021SF-259)

西安市科技计划项目(2021JH-03-0427)

<sup>1</sup> 西安医学院第一附属医院风湿免疫科(西安,710077)

<sup>2</sup> 西安医学院研究生工作部

<sup>3</sup> 西安市第五医院风湿免疫科

<sup>4</sup> 西安医学院第一附属医院药学部

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:Cl13379295579@163.com

<sup>1</sup> Department of Rheumatology and Immunology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China;

<sup>2</sup> Department of Graduate Work, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;

<sup>3</sup> Department of Rheumatology and Immunology, Xi'an Fifth Hospital, Xi'an 710082, China;

<sup>4</sup> Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China.

**Abstract Objective:** To explore the efficacy of Jintiang on the biological function of preosteoblasts under the interven-

tion of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) based on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods:** The fourth generation MC3T3-E1 cells were divided into normal group, TNF- $\alpha$  group (TNF- $\alpha$  15 ng/mL), TNF- $\alpha$  + 10  $\mu$ g/mL Jintiang group (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 10  $\mu$ g/mL Jintiang), TNF- $\alpha$  + 20  $\mu$ g/mL Jintiang group (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 20  $\mu$ g/mL Jintiang), TNF- $\alpha$  + 40  $\mu$ g/mL Jintiang group (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 40  $\mu$ g/mL Jintiang), Dickkopf related protein 1 (DKK1) group (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 40  $\mu$ g/mL Jintiang + 0.1  $\mu$ g/mL Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway inhibitor DKK1), and 40  $\mu$ g/mL Jintiang group (40  $\mu$ g/mL Jintiang), and all cells were cultured for 24 h with corresponding drugs. Cell proliferation was detected by CCK8 method. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-10 (IL-10) in cell supernatant were detected by ELISA. Cell ALP activity was detected by Kit assay. The Alizarin red staining was used to observe the mineralization and differentiation of cells. The expression of  $\beta$ -catenin, glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), run related transcription factor 2 (RUNX2), nuclear factor- $\kappa$ B receptor activating factor ligand (RANKL), and osteoprotegerin (OPG) were detected by qRT-PCR and Western Blot. **Results:** Compared with the normal group, the cell survival rate, ALP activity, relative absorbance value, number of calcium nodules, the level of IL-10 in the supernatant, and the expression of p- $\beta$ -catenin, p-GSK-3 $\beta$ , RUNX2, and OPG in the TNF- $\alpha$  group decreased obviously, while the apoptosis rate, the levels of IL-6 and IL-1 $\beta$  in supernatant, and the expression of RANKL increased ( $P < 0.05$ ). The cell survival rate, ALP activity, relative absorbance value, number of calcium nodules, and the expression of p- $\beta$ -catenin, p-GSK-3 $\beta$ , RUNX2, and OPG in the 40  $\mu$ g/mL Jintiang group increased, while the cell apoptosis rate, and the expression of RANKL decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with TNF- $\alpha$  group, the cell survival rate, ALP activity, relative absorbance value, number of calcium nodules, the level of IL-10 in the supernatant, and the expression of p- $\beta$ -catenin, p-GSK-3 $\beta$ , RUNX2, and OPG in the TNF- $\alpha$  + 10  $\mu$ g/mL Jintiang group, TNF- $\alpha$  + 20  $\mu$ g/mL Jintiang group, TNF- $\alpha$  + 40  $\mu$ g/mL Jintiang group decreased obviously, while the apoptosis rate, the levels of IL-6 and IL-1 $\beta$  in supernatant, and the expression of RANKL increased ( $P < 0.05$ ). DKK1, an inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, reversed the effects of Jintiang on TNF- $\alpha$  stimulated osteoblast proliferation and differentiation, and increased cell apoptosis and inflammatory response. **Conclusion:** Jintiang can inhibit TNF- $\alpha$ -induced apoptosis and inflammation of osteoblasts through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and promote cell proliferation and differentiation.

**Keywords:** Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway; Jintiang; preosteoblasts; biological function

类风湿性关节炎(RA)与多种因素相关,炎性条件抑制成骨细胞的生物学功能并有助于类风湿性关节炎的发生<sup>[1-2]</sup>。因此,提高炎性环境中成骨细胞的功能是对防治类风湿性关节炎的关键。研究发现金天格胶囊具有与虎骨相似的化学成分和药理作用,具有抗炎以及促进成骨细胞分化的作用,但其对类风湿性关节炎治疗的分子机制尚不明确<sup>[3-4]</sup>。Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(Wnt/ $\beta$ -catenin)信号通路可通过抑制前成骨细胞凋亡,促进成骨细胞分化<sup>[5]</sup>。本研究通过肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )干预前成骨细胞 MC3T3-E1 模拟类风湿性关节炎炎性环境,旨在研究金天格胶囊对前成骨细胞生物学功能影响及其作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 购自武汉普诺塞生命科技有限公司。

### 1.2 实验试剂

金天格胶囊(Z20030080, 0.4 g/粒)购自金花企业(集团)股份有限公司西安金花制药厂; Annexin V FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(70-APCC101-100)杭州联科生物技术股份有限公司; 小鼠 IL-6 (E-EL-

M2453c)、IL-1 $\beta$  (E-EL-M0037c)、IL-10 (E-EL-M0046c) ELISA 试剂盒以及碱性磷酸酶(ALP)比色法测试盒购自武汉伊莱瑞特公司; 抗体 p- $\beta$ -catenin (PA5-37543)、 $\beta$ -catenin (MA5-15739)、p-GSK-3 $\beta$  (44-604G)、糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ , 39-9500) 购自 Thermo Fisher 公司; 抗体 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2, ab192256)、核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL, ab45039)、骨保护素 (OPG, ab73400)、GAPDH (ab8245) 和 HRP 偶联的二抗 (ab6721) 购自英国 Abcam 公司。

### 1.3 细胞培养和分组

MC3T3-E1 细胞在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基,培养在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37  $^{\circ}$ C 培养箱中,每 2~3 d 换液 1 次。

取第 4 代细胞进行实验,将细胞分为正常组、TNF- $\alpha$  组<sup>[6]</sup> (TNF- $\alpha$  15 ng/mL)、TNF- $\alpha$  + 10  $\mu$ g/mL 金天格组<sup>[4]</sup> (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 10  $\mu$ g/mL 金天格胶囊)、TNF- $\alpha$  + 20  $\mu$ g/mL 金天格组 (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 20  $\mu$ g/mL 金天格胶囊)、TNF- $\alpha$  + 40  $\mu$ g/mL 金天格组 (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 40  $\mu$ g/mL 金天格胶囊)、DKK1 组<sup>[7]</sup> (TNF- $\alpha$  15 ng/mL + 40  $\mu$ g/mL 金天格胶囊 + 0.1  $\mu$ g/mL Wnt/ $\beta$ -catenin

信号通路抑制剂 DKK1)、40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组(40  $\mu\text{g/mL}$  金天格胶囊),各组细胞均使用相应药物共培养 24 h。

1.4 检测项目

1.4.1 CCK8 法检测增殖 将第 4 代细胞以  $5\times 10^4$  个/孔的密度接种在 96 孔板中,培养 24 h 后加入各组细胞培养液继续培养 48 h,随后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。

1.4.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集各组细胞,使用 PBS 洗涤 2 次后 100  $\mu\text{L}$  Binding Buffer 缓冲液重悬细胞,加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 充分混匀后加入 10  $\mu\text{L}$  PI 染液室温避光孵育 10 min,利用流式细胞仪分析各组细胞凋亡情况。

1.4.3 ELISA 法检测细胞上清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10 水平 收集各组细胞上清,通过 ELISA 试剂盒检测细胞上清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10 水平,实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.4.4 ALP 试剂盒法检测细胞 ALP 活性 将各组

细胞在成骨诱导培养基中培养 14 d 后,用 4%多聚甲醛在 4  $^{\circ}\text{C}$  下固定 10 min。然后根据 ALP 试剂盒说明书检测各组成骨细胞 ALP 活性。

1.4.5 茜素红染色观察细胞矿化分化情况 将各组细胞在成骨诱导培养基中培养 14 d 后,4%多聚甲醛在 4  $^{\circ}\text{C}$  下固定 30 min,然后用 2%茜素红 S 在室温下染色 10 min,使用显微镜观察骨结节并拍摄图片,然后加入 10%乙酸溶解染色,酶标仪检测在 450 nm 吸光度。

1.4.6 qRT-PCR 法检测细胞分化和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关指标 mRNA 的影响 收集各组细胞,加入 Trizol 试剂提取总 RNA,并检测 RNA 浓度和纯度。然后使用反转录试剂盒进行 cDNA 合成,使用 qRT-PCR 反应试剂盒进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  下预变性 30 s,95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  34 s,然后循环 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,共 40 个循环。对以下基因进行了定量检测: $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、RANKL、OPG、GAPDH 作为内参基因。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
$\beta$ -catenin	GCTGATTTGATGGAGTTGGA	GCTACTTGTTCTTGAGTGAA
GSK-3 $\beta$	CCGGGTTCCCATGTCCCCGGCGAAT	AGGCTGCTGCACCGGCTTGCACT
RANKL	CAGGACTCGACTCTGGAGAGTG	AACCATGAGCCTTCCATCATAG
RUNX2	ACGAGGCAAGAGTTTCACCT	TGTCTGTGCCTTCTTGGTTC
OPG	GGAGGAAGACATTGTGTGTCC	TCCTCACACTCACACACTCGGT
GAPDH	TGAAGGGTGGAGCCAAAAG	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

1.4.7 Western-Blot 检测细胞分化和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白的影响 收获各组细胞,用 RIPA 裂解缓冲液裂解提取总蛋白,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测浓度。蛋白质变性后使用 10%SDS-PAGE 分离蛋白,然后转移到 PVDF 膜。用 5%脱脂牛奶在室温下封闭膜 1 h,分别加入一抗 p- $\beta$ -catenin、 $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$ 、GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、RANKL、OPG、GAPDH 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜,加入二抗室温下孵育 1 h,然后加入 ECL 试剂显色观察,Image J 软件对蛋白条带进行,GAPDH 蛋白作为内部参照。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件对所得的数据进行统计分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  形式表示。不同组间的比较进行单因素方差分析,两组间比较使用 SNK- $q$  检验。 $P<0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$  作用下 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

与正常组相比,TNF- $\alpha$  组细胞存活率显著下降,40  $\mu\text{g/mL}$ 金天格组细胞存活率升高,差异有统计学意

义( $P<0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组相比,TNF- $\alpha$ +10  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +20  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞存活率显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比,DKK1 组细胞存活率下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$  作用下 MC3T3-E1 细胞增殖的影响( $\bar{x}\pm s,n=6$ )

组别	细胞存活率/%
正常组	96.27 $\pm$ 2.92
TNF- $\alpha$ 组	68.14 $\pm$ 2.25 <sup>1)</sup>
TNF- $\alpha$ +10 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	76.35 $\pm$ 2.29 <sup>2)</sup>
TNF- $\alpha$ +20 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	81.62 $\pm$ 2.37 <sup>2)3)</sup>
TNF- $\alpha$ +40 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	88.43 $\pm$ 2.69 <sup>2)3)4)</sup>
DKK1 组	79.61 $\pm$ 2.58 <sup>5)</sup>
40 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	104.87 $\pm$ 2.95 <sup>1)</sup>
$F$	138.846
$P$	<0.001

注:1)与正常组相比, $P<0.05$ ;2)与 TNF- $\alpha$  组相比, $P<0.05$ ;3)与 TNF- $\alpha$ +10  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比, $P<0.05$ ;4)与 TNF- $\alpha$ +20  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比, $P<0.05$ ;5)与 TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比, $P<0.05$ 。

## 2.2 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$ 作用下 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

与正常组相比, TNF- $\alpha$  组细胞凋亡率显著升高, 40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$  组相比, TNF- $\alpha$ +10  $\mu\text{g/mL}$  金

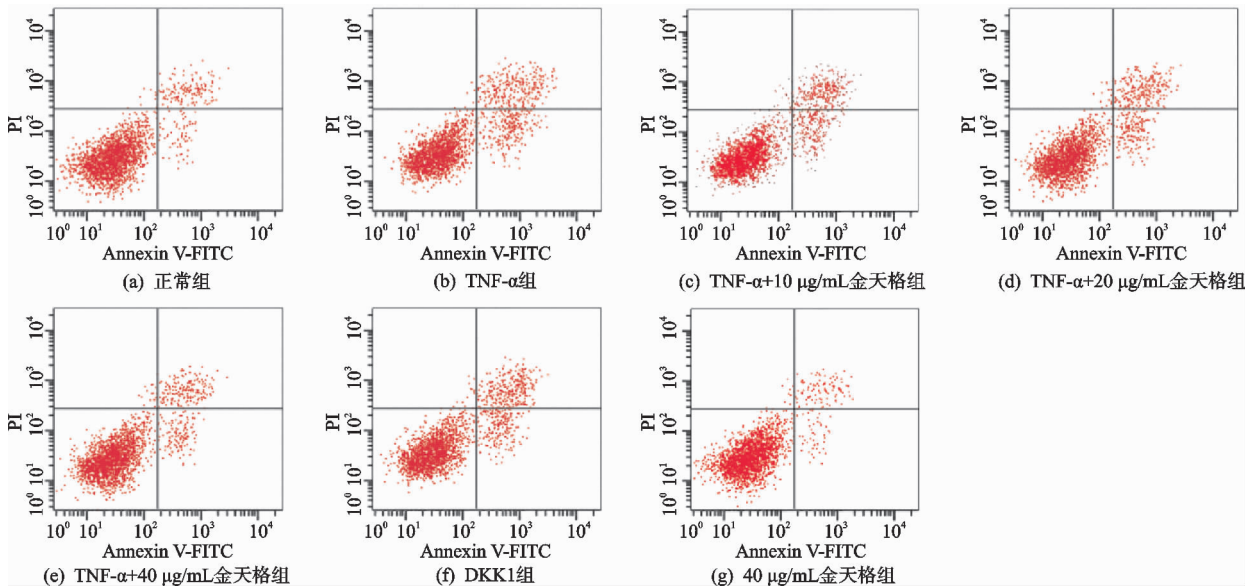


图 1 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$  作用下 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

表 3 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$  作用下 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	细胞凋亡率/%
正常组	5.31 $\pm$ 0.22
TNF- $\alpha$ 组	22.93 $\pm$ 1.16 <sup>1)</sup>
TNF- $\alpha$ +10 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	17.40 $\pm$ 1.11 <sup>2)</sup>
TNF- $\alpha$ +20 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	14.52 $\pm$ 0.68 <sup>2)3)</sup>
TNF- $\alpha$ +40 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	10.86 $\pm$ 0.53 <sup>2)3)4)</sup>
DKK1 组	16.23 $\pm$ 0.59 <sup>5)</sup>
40 $\mu\text{g/mL}$ 金天格组	3.64 $\pm$ 0.20 <sup>1)</sup>
<i>F</i>	525.408
<i>P</i>	<0.001

注:1)与正常组相比,  $P<0.05$ ;2)与 TNF- $\alpha$  组相比,  $P<0.05$ ;3)与 TNF- $\alpha$ +10  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比,  $P<0.05$ ;4)与 TNF- $\alpha$ +20  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比,  $P<0.05$ ;5)与 TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比,  $P<0.05$ 。

## 2.3 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$ 作用下 MC3T3-E1 细胞分化的影响

与正常组相比, TNF- $\alpha$  组细胞 ALP 活性、相对吸光度值以及钙结节显著减少, 40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞 ALP 活性、相对吸光度值以及钙结节显著升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$  组相比, TNF- $\alpha$ +10  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +20  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞 ALP 活性、相对吸光度值以及钙结节显著升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比, DKK1 组 ALP 活性、相对吸光度值以及钙结节显著降

低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$ +20  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比, DKK1 组细胞凋亡率显著升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见图 1 和表 3。

低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见图 2 和表 4。

## 2.4 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$ 作用下 MC3T3-E1 细胞上清炎症因子的影响

与正常组相比, TNF- $\alpha$  组细胞上清 IL-6、IL-1 $\beta$  水平升高, IL-10 水平降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞上清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10 水平无明显变化, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$  组相比, TNF- $\alpha$ +10  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +20  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞上清 IL-6、IL-1 $\beta$  水平降低, IL-10 水平升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组相比, DKK1 组上清 IL-6、IL-1 $\beta$  水平升高, IL-10 水平降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表 5。

## 2.5 金天格胶囊对 TNF- $\alpha$ 作用下 MC3T3-E1 细胞分化和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关 mRNA 表达的影响

与正常组相比, TNF- $\alpha$  组细胞  $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、OPG mRNA 表达显著降低, RANKL mRNA 表达增加, 40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞  $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、OPG mRNA 表达显著升高, RANKL mRNA 表达降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$  组相比, TNF- $\alpha$ +10  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +20  $\mu\text{g/mL}$  金天格组、TNF- $\alpha$ +40  $\mu\text{g/mL}$  金天格组细胞  $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、RUNX2、OPG mRNA 表达显著升高, RANKL mRNA 表达降低, 差

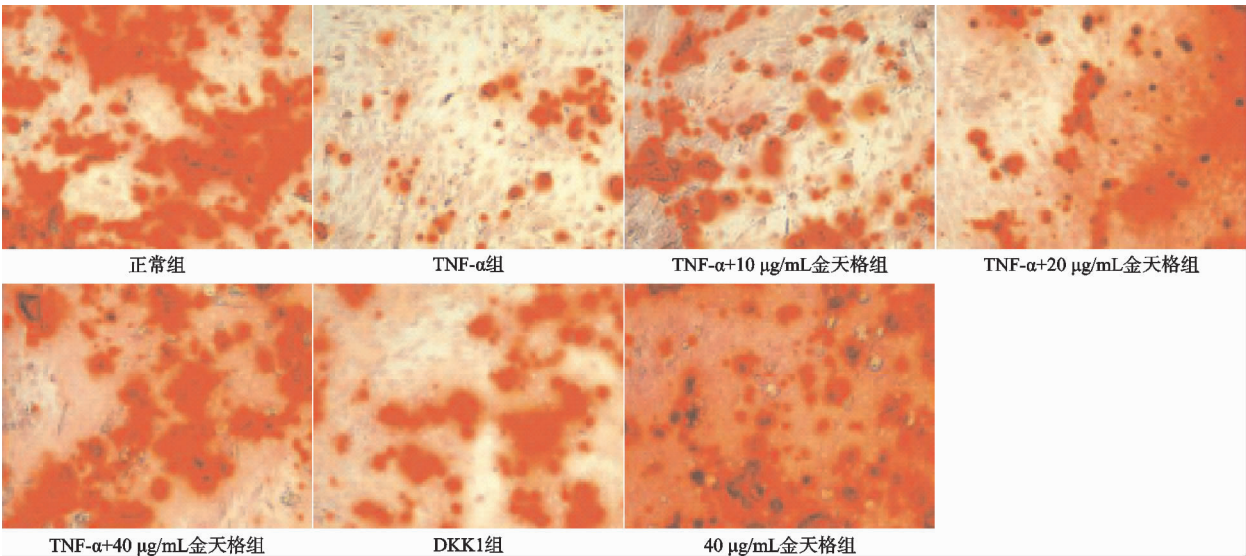


图 2 茜素红染色观察(×100)

表 4 金天格胶囊对 TNF-α 作用下 MC3T3-E1 细胞分化的影响(  $\bar{x} \pm s, n=6$  )

组别	ALP/(mg · mL <sup>-1</sup> )	相对吸光度值(OD <sub>450</sub> )
正常组	0.64±0.06	1.00±0.09
TNF-α 组	0.25±0.02 <sup>1)</sup>	0.31±0.03 <sup>D</sup>
TNF-α+10 μg/mL 金天格组	0.36±0.03 <sup>2)</sup>	0.44±0.05 <sup>2)</sup>
TNF-α+20 μg/mL 金天格组	0.48±0.05 <sup>2)3)</sup>	0.57±0.06 <sup>2)3)</sup>
TNF-α+40 μg/mL 金天格组	0.59±0.06 <sup>2)3)4)</sup>	0.71±0.08 <sup>2)3)4)</sup>
DKK1 组	0.41±0.04 <sup>5)</sup>	0.52±0.04 <sup>5)</sup>
40 μg/mL 金天格组	0.75±0.07 <sup>1)</sup>	1.25±0.10 <sup>1)</sup>
F	72.297	139.613
P	<0.001	<0.001

注:1)与正常组相比, $P<0.05$ ;2)与 TNF-α 组相比, $P<0.05$ ;3)与 TNF-α+10 μg/mL 金天格组相比, $P<0.05$ ;4)与 TNF-α+20 μg/mL 金天格组相比, $P<0.05$ ;5)与 TNF-α+40 μg/mL 金天格组相比, $P<0.05$ 。

表 5 金天格胶囊对 TNF-α 作用下 MC3T3-E1 细胞上清炎症因子的影响(  $\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$  )

组别	IL-6	IL-1β	IL-10
正常组	59.93±2.56	98.67±3.94	69.52±2.31
TNF-α 组	127.37±3.09 <sup>1)</sup>	262.34±4.86 <sup>1)</sup>	17.26±1.06 <sup>1)</sup>
TNF-α+10 μg/mL 金天格组	109.46±2.85 <sup>2)</sup>	231.29±4.65 <sup>2)</sup>	29.15±1.38 <sup>2)</sup>
TNF-α+20 μg/mL 金天格组	92.29±2.81 <sup>2)3)</sup>	194.73±4.49 <sup>2)3)</sup>	40.57±1.62 <sup>2)3)</sup>
TNF-α+40 μg/mL 金天格组	71.54±2.67 <sup>2)3)4)</sup>	156.91±4.17 <sup>2)3)4)</sup>	53.84±1.88 <sup>2)3)4)</sup>
DKK1 组	96.75±2.79 <sup>5)</sup>	209.47±4.38 <sup>5)</sup>	34.93±1.73 <sup>5)</sup>
40 μg/mL 金天格组	54.91±2.52	93.56±3.66	72.71±2.57
F	558.242	1 341.840	750.972
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与正常组相比, $P<0.05$ ;2)与 TNF-α 组相比, $P<0.05$ ;3)与 TNF-α+10 μg/mL 金天格组相比, $P<0.05$ ;4)与 TNF-α+20 μg/mL 金天格组相比, $P<0.05$ ;5)与 TNF-α+40 μg/mL 金天格组相比, $P<0.05$ 。

异有统计学意义( $P<0.05$ );与 TNF-α+40 μg/mL 金天格组相比, DKK1 组 β-catenin、GSK-3β、RUNX2、OPG mRNA 表达显著降低, RANKL mRNA 表达增加, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表 6。

2.6 金天格胶囊对 TNF-α 作用下 MC3T3-E1 细胞分化和 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

与正常组相比, TNF-α 组细胞 p-β-catenin、p-

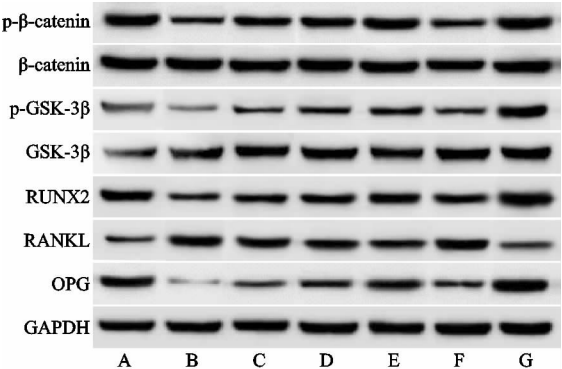
GSK-3β、RUNX2、OPG 蛋白表达显著降低, RANKL 蛋白表达增加, 40 μg/mL 金天格组细胞 p-β-catenin、p-GSK-3β、RUNX2、OPG 蛋白表达显著升高, RANKL 蛋白表达降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 TNF-α 组相比, TNF-α+10 μg/mL 金天格组、TNF-α+20 μg/mL 金天格组、TNF-α+40 μg/mL 金天格组细胞 p-β-catenin、p-GSK-3β、RUNX2、OPG 蛋白表达显著升高, RANKL 蛋白表达降低, 差异有统

表 6 金天格胶囊对 TNF-α 作用下 MC3T3-E1 细胞分化和 Wnt/β-catenin 信号通路相关 mRNA 表达的影响(±s, n=6)

组别	β-catenin	GSK-3β	RUNX2	RANKL	OPG
正常组	1.01±0.10	1.03±0.09	1.02±0.08	1.01±0.07	1.04±0.08
TNF-α 组	0.31±0.02 <sup>1)</sup>	0.26±0.01 <sup>1)</sup>	0.22±0.02 <sup>1)</sup>	1.73±0.15 <sup>1)</sup>	0.35±0.03 <sup>1)</sup>
TNF-α+10 μg/mL 金天格组	0.43±0.04 <sup>2)</sup>	0.39±0.03 <sup>2)</sup>	0.37±0.03 <sup>2)</sup>	1.51±0.13 <sup>2)</sup>	0.52±0.05 <sup>2)</sup>
TNF-α+20 μg/mL 金天格组	0.59±0.05 <sup>2)3)</sup>	0.51±0.06 <sup>2)3)</sup>	0.55±0.05 <sup>2)3)</sup>	1.30±0.10 <sup>2)3)</sup>	0.67±0.06 <sup>2)3)</sup>
TNF-α+40 μg/mL 金天格组	0.72±0.08 <sup>2)3)4)</sup>	0.64±0.07 <sup>2)3)4)</sup>	0.73±0.07 <sup>2)3)4)</sup>	1.09±0.09 <sup>2)3)4)</sup>	0.80±0.06 <sup>2)3)4)</sup>
DKK1 组	0.55±0.06 <sup>5)</sup>	0.45±0.05 <sup>5)</sup>	0.49±0.04 <sup>5)</sup>	1.42±0.12 <sup>5)</sup>	0.63±0.07 <sup>5)</sup>
40 μg/mL 金天格组	1.22±0.11 <sup>1)</sup>	1.19±0.10 <sup>1)</sup>	1.25±0.09 <sup>1)</sup>	0.83±0.08 <sup>1)</sup>	1.18±0.10 <sup>1)</sup>
F	119.689	166.159	226.169	49.320	110.746
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与正常组相比,  $P<0.05$ ;2)与 TNF-α 组相比,  $P<0.05$ ;3)与 TNF-α+10 μg/mL 金天格组相比,  $P<0.05$ ;4)与 TNF-α+20 μg/mL 金天格组相比,  $P<0.05$ ;5)与 TNF-α+40 μg/mL 金天格组相比,  $P<0.05$ 。

计学意义( $P<0.05$ );与 TNF-α+40 μg/mL 金天格组相比, DKK1 组 p-β-catenin、p-GSK-3β、RUNX2、OPG 蛋白表达显著降低, RANKL 蛋白表达增加, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见图 3 和表 7。



注: A为正常组; B为TNF-α组; C为TNF-α+10 μg/mL金天格组; D为TNF-α+20 μg/mL金天格组; E为TNF-α+40 μg/mL金天格组; F为DKK1组; G为40 μg/mL金天格组

图 3 金天格胶囊对 TNF-α 作用下 MC3T3-E1 细胞分化和 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

3 讨论

本研究将小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 作为研究对象, 探讨了金天格胶囊对 TNF-α 干预下的 MC3T3-E1 细胞的生物功能学影响。成骨细胞在类风湿性关节炎病理学中十分重要, 促炎因子抑制成骨细胞的分化和功能, 导致净骨质流失<sup>[2]</sup>。TNF-α 介导炎症反应和细胞损伤, 已有研究证明 TNF-α 抑制成骨细胞分化, 外源性添加 TNF-α 可模拟类风湿性关节炎环境<sup>[8]</sup>。另外, TNF-α 促进成骨细胞 IL-6 的分泌, IL-6 进一步促进成骨细胞表面 RANKL 表达, 进一步活化破骨细胞, 加重类风湿性关节炎症状<sup>[9]</sup>。碱性磷酸酶是成骨细胞分化早期表达的必需酶, 其表达在分化过程中增加, 被用作成骨细胞早期分化的标志物<sup>[10]</sup>。RUNX2 被认为是介导成骨细胞分化的最主要因素, 其可上调与成骨细胞分化有关的因子表达, 例如碱性磷酸酶<sup>[11]</sup>。在成骨细胞发生中, RUNX2 在未分化的 MSC 细胞中轻微表达, 并且在前期成骨细胞的增殖过

表 7 金天格胶囊对 TNF-α 作用下 MC3T3-E1 细胞分化和 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白表达的影响(±s, n=6)

组别	p-β-catenin/β-catenin	p-GSK-3β/GSK-3β	RUNX2	RANKL	OPG
正常组	1.03±0.10	0.83±0.08	1.21±0.12	0.45±0.04	0.97±0.09
TNF-α 组	0.46±0.05 <sup>1)</sup>	0.23±0.02 <sup>1)</sup>	0.52±0.06 <sup>1)</sup>	1.18±0.11 <sup>1)</sup>	0.19±0.01 <sup>1)</sup>
TNF-α+10 μg/mL 金天格组	0.62±0.07 <sup>2)</sup>	0.37±0.03 <sup>2)</sup>	0.71±0.07 <sup>2)</sup>	1.01±0.09 <sup>2)</sup>	0.36±0.03 <sup>2)</sup>
TNF-α+20 μg/mL 金天格组	0.78±0.08 <sup>2)3)</sup>	0.52±0.05 <sup>2)3)</sup>	0.89±0.09 <sup>2)3)</sup>	0.83±0.08 <sup>2)3)</sup>	0.55±0.05 <sup>2)3)</sup>
TNF-α+40 μg/mL 金天格组	0.94±0.09 <sup>2)3)4)</sup>	0.71±0.06 <sup>2)3)4)</sup>	1.11±0.10 <sup>2)3)4)</sup>	0.62±0.06 <sup>2)3)4)</sup>	0.78±0.07 <sup>2)3)4)</sup>
DKK1 组	0.69±0.06 <sup>5)</sup>	0.43±0.04 <sup>5)</sup>	0.74±0.08 <sup>5)</sup>	0.95±0.08 <sup>5)</sup>	0.41±0.04 <sup>5)</sup>
40 μg/mL 金天格组	1.22±0.12 <sup>1)</sup>	0.96±0.07 <sup>1)</sup>	1.42±0.13 <sup>1)</sup>	0.27±0.02 <sup>1)</sup>	1.16±0.11 <sup>1)</sup>
F	57.038	143.616	65.748	115.280	171.589
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与正常组相比,  $P<0.05$ ;2)与 TNF-α 组相比,  $P<0.05$ ;3)与 TNF-α+10 μg/mL 金天格组相比,  $P<0.05$ ;4)与 TNF-α+20 μg/mL 金天格组相比,  $P<0.05$ ;5)与 TNF-α+40 μg/mL 金天格组相比,  $P<0.05$ 。

程中表达升高<sup>[12]</sup>。RANKL 是一种同源三聚体跨膜蛋白, 由成骨细胞分泌刺激前成骨细胞在骨骼中的分化<sup>[13]</sup>。另外, RUNX2 可通过增加 OPG/RANKL 的比率, 进而促进成骨细胞分化<sup>[11]</sup>。Gao 等<sup>[12]</sup>研究结果

表明, 丹参多酚酸盐可减轻类风湿性关节炎大鼠骨质流失和骨质恶化, 同时丹参多酚酸盐可抑制 TNF-α 诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞炎症反应、增加 RUNX2 和 OPG 的表达同时减少 RANKL 的表达, 表明丹参多酚



酸盐可促进 MC3T3-E1 细胞的分化,减轻炎症。本研究表明,经 TNF- $\alpha$  干预后,小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 存活率、碱性磷酸酶活性、钙结节数量、细胞上清 IL-10 水平以及 RANKL 蛋白表达明显下降,细胞凋亡率、细胞上清 IL-6、IL-1 $\beta$  水平以及 RUNX2 和 OPG 蛋白表达升高,使用金天格胶囊干预后,明显增加了小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 增殖和分化,并可抑制细胞凋亡和促炎因子的分泌并促进抗炎因子的分泌。值得注意的是,金天格胶囊单独干预 MC3T3-E1 细胞也可明显促进细胞增殖和分化,抑制细胞凋亡,表明金天格胶囊对前成骨细胞具有催分化作用,并对模拟类风湿性关节炎的 TNF- $\alpha$  刺激诱导的前成骨细胞具有抑制炎症、促进增殖和分化作用。

Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(Wnt/ $\beta$ -catenin)信号通路参与成骨细胞增殖、凋亡和分化的调节,Wnt 配体与其受体结合激活下游信号级联,导致  $\beta$ -catenin 易位到细胞核中,进而增强成骨细胞靶基因表达<sup>[15]</sup>。 $\beta$ -catenin 的遗传缺失会导致骨骼结构缺失和成骨细胞分化停滞,另外,OPG 表达也与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关<sup>[5-6]</sup>。Sang 等<sup>[16]</sup>研究发现在雌激素缺乏诱导的骨质疏松症中,TNF- $\alpha$  通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导来抑制骨形成。Li 等<sup>[17]</sup>研究发现 IL-35 可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,促进 TNF- $\alpha$  诱导的类风湿性关节炎中前成骨细胞 MC3T3E1 的增殖、碱性磷酸酶活性和矿化作用,并抑制成骨细胞凋亡,DKK1 阻断 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,进而抑制 IL-35 的成骨作用。另外,Shen 等<sup>[18]</sup>研究发现赆痹片可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,上调成骨基因,促进类风湿性关节炎小鼠成骨细胞功能,减缓类风湿性关节炎炎症症状并防止关节破坏。本研究发现,经 TNF- $\alpha$  刺激诱导后,MC3T3-E1 细胞中 p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$  表达显著下降,而金天格胶囊干预后,细胞 p- $\beta$ -catenin、p-GSK-3 $\beta$  表达明显升高,这与 Shen 等<sup>[18]</sup>研究结果基本一致,提示金天格胶囊可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路发挥对 MC3T3-E1 细胞的保护作用。使用 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制剂 DKK1 发现,DKK1 可逆转金天格胶囊对 MC3T3-E1 细胞的促增殖和促分化作用,表明金天格胶囊可通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进 TNF- $\alpha$  刺激的前成骨细胞的增殖和分化作用,并抑制炎症反应。

综上所述,在类风湿性关节炎中,金天格胶囊可通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 TNF- $\alpha$  诱导的前成骨细胞的凋亡和炎症,促进细胞增殖和分化,为金天格胶囊治疗类风湿性关节炎奠定理论基础。但本研究仅从体外实验验证金天格胶囊对类风湿性关节炎中前成骨细胞的调控作用,本研究后续将通过动

物实验进一步验证金天格胶囊对类风湿性关节炎的治疗机制。

## 参考文献

- [1] HUANG C C, TSENG T T, LIU S C, et al. S1P increases VEGF production in osteoblasts and facilitates endothelial progenitor cell angiogenesis by inhibiting miR-16-5p expression via the c-Src/FAK signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2168.
- [2] BERARDI S, CORRADO A, MARUOTTI N, et al. Osteoblast role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(3): 2843-2852.
- [3] LI Y, ZHANG Z, CUI F, et al. Traditional Chinese medicine bionic tiger bone powder for the treatment of AI-associated musculoskeletal symptoms[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017: 2478565.
- [4] SHEN Y, WANG N, ZHANG Q, et al. Jin-Tian-Ge ameliorates ovariectomy-induced bone loss in rats and modulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in vitro [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 78.
- [5] MAEDA K, KOBAYASHI Y, KOIDE M, et al. The regulation of bone metabolism and disorders by Wnt signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5525.
- [6] LI S, YIN Y, YAO L, et al. TNF- $\alpha$  treatment increases DKK1 protein levels in primary osteoblasts via upregulation of DKK1 mRNA levels and downregulation of miR-335-5p[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 1017-1025.
- [7] HONG W, ZHANG W. Hesperidin promotes differentiation of alveolar osteoblasts via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2020, 40(5): 442-448.
- [8] HAMEISTER R, LOHMANN C H, DHEEN S T, et al. The effect of TNF- $\alpha$  on osteoblasts in metal wear-induced periprosthetic bone loss[J]. *Bone Joint Res*, 2020, 9(11): 827-839.
- [9] HIOKI T, TOKUDA H, KUROYANAGI G, et al. Olive polyphenols attenuate TNF- $\alpha$ -stimulated M-CSF and IL-6 synthesis in osteoblasts; suppression of Akt and p44/p42 MAP kinase signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111816.
- [10] JEONG M J, LIM D S, KIM S O, et al. Effect of rosmarinic acid on differentiation and mineralization of MC3T3-E1 osteoblastic cells on titanium surface[J]. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 2021, 25(1): 46-55.
- [11] YEOM J, MA S, LIM Y H. Probiotic propionibacterium freudenreichii MJ2 enhances osteoblast differentiation and mineralization by increasing the OPG/RANKL ratio[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 673.

- [20] ZHANG X, GUO Q, CHEN J, et al. Quercetin enhances cisplatin sensitivity of human osteosarcoma cells by modulating microRNA-217-KRAS axis[J]. *Mol Cells*, 2015, 38(7):638-642.
- [21] ZANG X, CHENG M, ZHANG X, et al. Quercetin nano-formulations: a promising strategy for tumor therapy[J]. *Food Funct*, 2021, 12(15):6664-6681.
- [22] LOU M, ZHANG L N, JI P G, et al. Quercetin nanoparticles induced autophagy and apoptosis through AKT/ERK/Caspase-3 signaling pathway in human neuroglioma

cells; in vitro and in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84:1-9.

- [23] RIVA A, RONCHI M, PETRANGOLINI G, et al. Improved oral absorption of quercetin from quercetin phytosome: a new delivery system based on food grade lecithin[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 44(2):169-177.
- [24] 胡菲, 车智慧, 王哲, 等. 不同稳定剂修饰的槲皮素纳米晶在大鼠体内注射药动学及组织分布研究[J]. *中草药*, 2022, 53(9):2697-2705.

(收稿日期:2022-12-05)

(上接第7页)

- [12] AMARASEKARA D S, KIM S, RHO J. Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6):2851.
- [13] KOVÁCS B, VAJDA E, NAGY E E. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4653.
- [14] GAO X, WU Q, ZHANG X, et al. Salvianolate ameliorates osteopenia and improves bone quality in prednisone-treated rheumatoid arthritis rats by regulating RANKL/RANK/OPG signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:710169.
- [15] HOUSCHYAR K S, TAPKING C, BORRELLI M R, et al. Wnt pathway in bone repair and regeneration-what do we know so far[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 6:170.

- [16] SANG C, ZHANG Y, CHEN F, et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses osteogenic differentiation of MSCs by inhibiting semaphorin 3B via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in estrogen-deficiency induced osteoporosis[J]. *Bone*, 2016, 84:78-87.

- [17] LI Y, YUAN L, JIANG S, et al. Interleukin-35 stimulates tumor necrosis factor- $\alpha$  activated osteoblasts differentiation through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75:105810.

- [18] SHEN W, GUAN Y Y, WU R M, et al. Protective effects of Wang-Bi tablet on bone destruction in collagen-induced arthritis by regulating osteoclast-osteoblast functions[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238:111861.

(收稿日期:2022-11-18)