

## • 实验研究 •

## 加味六味地黄汤对巨首相关蛋白-1 基因的影响

刘明明<sup>1</sup> 陈翀<sup>2</sup> 许海燕<sup>2</sup> 杨伏猛<sup>1</sup> 吕南宁<sup>1</sup> 李洪叶<sup>1△</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨加味六味地黄汤在骨髓间充质干细胞(BMSCs)高糖应激下巨首相关蛋白-1(DKK1)基因胞嘧啶羟甲基化的作用机制。**方法:**将雄性 SD 大鼠随机分为空白组(等量生理盐水)和加味六味地黄汤干预组(24.255 g/kg)灌胃干预,制备含药血清。加味六味地黄汤含药血清干预骨髓间充质干细胞 48 h,通过 qRT-PCR 和 ELISA 测定高糖应激下 DKK1 基因及蛋白的表达;用双荧光素酶报告基因检测高糖应激下 DKK1 基因启动子活性;5-hmC 和 5-mC 分析加味六味地黄汤含药血清对高糖应激下 DKK1 基因启动子区的 CpG 甲基化和羟甲基化水平及 Abct 和 Pgk1 基因启动子区的羟甲基化水平;通过 TETs 活性及 qRT-PCR 测定加味六味地黄汤含药血清对 TETs 活性及 TETs 基因表达水平的影响。**结果:**与 0%含药血清相比,20%加味六味地黄汤含药血清可以显著抑制高糖状态下 DKK1 mRNA 表达水平,差异有统计学意义( $P<0.01$ );同时显著减少培养上清中 DKK1 的浓度,差异有统计学意义( $P<0.01$ );抑制了高糖诱导的 DKK1 启动子活性,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。5-hmC 和 5-mC 分析结果显示 20%加味六味地黄汤含药血清降低了 DKK1 启动子区羟甲基化水平,差异有统计学意义( $P<0.05$ );同时提高了该区域甲基化水平,差异有统计学意义( $P<0.01$ );加味六味地黄汤含药血清对 TETs 的活性没有显著影响,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提高了 TET2 基因表达水平,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论:**加味六味地黄汤选择性抑制 DKK1 基因胞嘧啶羟甲基化,减轻高糖应激诱发的小鼠骨髓间充质干细胞 DKK1 表达。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;加味六味地黄汤;巨首相关蛋白-1;胞嘧啶羟甲基化;糖尿病性骨质疏松症

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)07-0011-07

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240702

## Effect of Modified Liuwei Dihuang Decoction on Cytosine Hydroxymethylation of Dickkopf-Related Protein 1 Gene in BMSCs under High Glucose Stress

LIU Mingming<sup>1</sup> CHEN Chong<sup>2</sup> XU Haiyan<sup>2</sup> YANG Fumeng<sup>1</sup> LÜ Nanning<sup>1</sup> LI Hongye<sup>1△</sup><sup>1</sup>Lianyungang Clinical College of Xuzhou Medical University, Lianyungang 222003, Jiangsu China;<sup>2</sup>Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of modified Liuwei Dihuang decoction on cytosine hydroxymethylation of dickkopf-related protein 1 (DKK1) gene in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) under high glucose stress.

**Methods:** Male SD rats were randomly divided into blank group (equivalent normal saline) and intervention group treated with a modified Liuwei Dihuang decoction (24.255 g/kg) by gavage to prepare medicated serum. BMSCs were treated

with 20% serum containing modified Liuwei Dihuang decoction for 48 h, and the relative protein and gene expression levels of DKK1 were analyzed by qRT-PCR and ELISA tests under high-glucose environments. Dual luciferase reporter gene assay was employed to evaluate the the DKK1 promoter activity. The 5-hmC and 5-mC was used to analyze the methylation level of the DKK1 gene and hydroxymethylation level of CpG island of the DKK1, Abct and Pgk1 genes under high glucose stress. TETs activity and qRT-PCR were used to detected the TET (ten-eleven translocation) ac-

基金项目:江苏省卫生健康委医学科研项目(H2023049)

连云港市第六期“521 高层次人才培养工程”科研项目(LYG06521202159)

连云港市中医药科技发展计划(重点项目)(ZD202210)

连云港市“十四五”花果山科教强医工程(连卫科教〔2021〕1号)

<sup>1</sup>徐州医科大学连云港临床学院(江苏 连云港,222003)

<sup>2</sup>徐州医科大学

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:li19816269587@163.com

tivity of TETs and expression level of TETs. **Results:** Compared with 0% modified Liuwei Dihuang decoction containing serum, 20% modified Liuwei Dihuang decoction containing serum significantly inhibited the expression level of DKK1 mRNA under high glucose conditions ( $P < 0.01$ ), while significantly reduced the concentration of DKK1 ( $P < 0.01$ ). Additionally, high-glucose-induced DKK1 promoter activity overexpression was attenuated ( $P < 0.01$ ). The results of 5-hmC and 5-mC analysis showed that 20% modified Liuwei Dihuang decoction containing serum reduced the hydroxymethylation level in the DKK1 promoter region ( $P < 0.05$ ), while increased the methylation level in this region ( $P < 0.01$ ). The 20% modified Liuwei Dihuang decoction containing serum had no significant effect on the activity of TETs ( $P > 0.05$ ). However, it can increase the expression level of TET2 gene ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Modified Liuwei Dihuang decoction selectively inhibits cytosine hydroxymethylation of DKK1 gene and alleviates the expression of DKK1 in high-glucose-induced BMSCs.

**Keywords:** bone marrow mesenchymal stem cells; modified Liuwei Dihuang decoction; dickkopf-related protein 1; cytosine hydroxymethylation; diabetic osteoporosis

糖尿病性骨质疏松症(Diabetic Osteoporosis, DOP)发病机制尚不明确,前期研究表明,加味六味地黄汤可改善糖尿病性骨质疏松症患者骨代谢,缓解腰背痛<sup>[1]</sup>。高糖可刺激骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)高表达胚胎期蛋白巨首相关蛋白-1(Dickkopf-Related Protein 1, DKK1)<sup>[2-3]</sup>,而胚胎期沉默基因再激活是一个复杂的表观遗传过程<sup>[4]</sup>,需对 CpG 岛胞嘧啶进行去甲基化以便转录因子结合<sup>[5]</sup>。因此,探索这一胞嘧啶羟甲基化过程有望为糖尿病性骨质疏松症的治疗提供新思路,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

用于制备含药血清的实验动物为 SPF 级 7~8 周龄雄性 SD 大鼠,共 16 只,体重为 180~200 g,徐州医科大学实验动物中心购买及饲养,许可证号为 SCXK(苏)2020-0011,徐州医科大学实验动物饲养管理与使用委员会(IACUC)伦理号为 202207S003。

### 1.2 细胞培养

小鼠骨髓间充质干细胞(武汉普诺赛公司 CP-M131),常规使用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基培养,每 4~5 d 胰酶消化传代 1 次,使用传代 5 次以内细胞进行实验。

### 1.3 实验药物与试剂

药物:加味六味地黄汤(组方:熟地黄 24 g,山茱萸 12 g,山药 12 g,牡丹皮 9 g,茯苓 9 g,泽泻 9 g,淫羊藿 12 g,怀牛膝 15 g,当归 12 g,连云港市第二人民医院)。

试剂: $\alpha$ -MEM 培养基(货号为 12571063,美国赛默飞公司),FBS(货号为 C04001-500,上海龙田生物科技有限公司),D-葡萄糖(货号为 ST1228,上海碧云天生物科技有限公司),DKK1 ELISA 试剂盒(货号为 MKK100,美国 R&D 公司),双荧光素酶报告基因试剂盒(货号为 DD1205-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司),Msp I、Hpa II、EpiMark 5-hmC 和 5-mC 分析试剂盒(货号为 E3317S,美国 NBE),Epigenase

5mC Hydroxylase TET Activity/Inhibition 试剂盒(货号为 P-3087-96,美国 EpigenTek 公司),Bobcat339(货号为 HY111558,美国 MCE 公司)。

### 1.4 实验仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱(Forma3110,美国),生物安全柜(Hfsafe-1500,上海力申科学仪器有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(上海罗氏诊断产品有限公司),PCR 扩增仪(PTC-100,美国 Applied Biosystems),电泳仪(164-5050)、电泳槽(165-8001)、电转槽(170-3930)均购自美国 Bio-rad 公司。

### 1.5 方法

**1.5.1 大鼠含药血清的制备** 将 16 只 SPF 级 7~8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为空白组和加味六味地黄汤干预组。加味六味地黄汤制备水煎液,加热浓缩至含药浓度 3 g/mL,参照大鼠与人等剂量换算公式,加味六味地黄汤剂量为 24.255 g/kg 对加味六味地黄汤干预组大鼠灌胃,空白组予等量生理盐水灌胃,2 次/d,连续灌胃 1 周,末次灌胃 2 h 后,深度麻醉大鼠,通过腹主动脉取血,4℃下 3 000 r/min 离心 15 min 取血清,56℃水浴灭活 30 min,滤器过滤除菌、分装保存备用。

**1.5.2 骨髓间充质干细胞高糖应激及加味六味地黄汤含药血清处理** 将骨髓间充质干细胞接种于 6 孔板或 10 cm 培养皿,加入不同浓度的葡萄糖将培养基调整至葡萄糖含量为 7.5 mmol/L(此浓度为不额外添加葡萄糖时含 10% FBS 的原始浓度)、15 mmol/L、25 mmol/L 和 50 mmol/L,每 4 d 换液 1 次,处理 1 周后进行后续实验。加味六味地黄汤处理骨髓间充质干细胞方法为在培养体系中添加 20% 含药血清后培养 48 h,以添加等量正常大鼠血清作为对照。

**1.5.3 ELISA 测定培养物上清中 DKK1 含量** 用小鼠 DKK1 ELISA 试剂盒测定培养上清中 DKK1 含量,按生产商说明书操作。

**1.5.4 双荧光素酶报告基因系统评价 DKK1 启动子活性** 采用 Lipofectamine 2000 共转染 pGL4-10-DKK1-luc(含有 DKK1 启动子区 -1 000~+100 bp

片段)和海肾荧光素酶质粒,转染后 24 h 裂解骨髓间充质干细胞并测定荧光素酶活性。采用双荧光素酶报告基因试剂盒,细胞裂解及荧光素酶定量均按说明书进行。

**1.5.5 DNA 胞嘧啶甲基化和羟甲基化分析** 骨髓间充质干细胞提取基因组 DNA,利用 T4  $\beta$ -葡萄糖基转移酶(T4-BGT)对羟甲基化的胞嘧啶残基进行葡萄糖基化处理。取 10  $\mu$ g 纯化后基因组 DNA,依照EpiMark 5-hmC 和 5-mC 分析试剂盒说明书加入 UDG-葡萄糖和 T4-BGT,37  $^{\circ}$ C 孵育 12 h。分别采用 Msp I 和 Hpa II 内切酶切割经 T4-BGT 处理或未经 T4-BGT 处理的基因组 DNA,切割完成后采用蛋白酶 K 消化残留的酶,95  $^{\circ}$ C 10 min 灭活蛋白酶 K,利用 qPCR 进行下一步分析。甲基化和羟甲基化 CCGG 序列比例按试剂盒说明书计算。

**1.5.6 TETs 活性测定** 采用 Epigenase 5-mC Hydroxylase TET Activity/Inhibition 试剂盒测定 TETs,评价 TETs 活性变化。阳性对照为 TETs 抑制剂 Bobcat339。实验过程如下:反应板中每孔加入 80  $\mu$ L 结合缓冲液,再加 2  $\mu$ L 0.5 $\times$ 人胸苷酸合成酶(TS)试剂,37  $^{\circ}$ C 孵育 90 min,150  $\mu$ L 蛋白免疫印迹

(WB)液洗板后加入促甲状腺激素受体抗体(TAB),再加入骨髓间充质干细胞核蛋白提取物和加味六味地黄汤含药血清补足每孔 50  $\mu$ L 总体积,37  $^{\circ}$ C 再孵育 90 min,再次 150  $\mu$ L 蛋白免疫印迹液洗板后加入 50  $\mu$ L 稀释后的人溶血补体(HC6)试剂,室温孵育 60 min,弃去 HC6,洗板后加入 50  $\mu$ L HC7,室温孵育 30 min 后洗板,再添加 50  $\mu$ L HC8,孵育 30 min 后洗板,加入 100  $\mu$ L 人硫酸皮肤素(DS)试剂,室温孵育 10 min 后加入 50  $\mu$ L 大鼠生长抑素(SS)试剂终止反应,在 450 nm 处使用酶标仪测定吸光度(OD)值, TETs 活性=[(药物组 OD-空白对照组 OD)/(未药物处理组 OD-空白对照组 OD)] $\times$ 100%。

**1.5.7 基因组 DNA、总 RNA 提取及反转录和 qPCR** 骨髓间充质干细胞采用蛋白酶 K 在 56  $^{\circ}$ C 下过夜消化,纯化基因组 DNA,Nanodrop 测定获得的基因组 DNA 浓度。总 RNA 采用 TRIZOL 法提取,采用 Oligo-dT 为引物 HiScript III 逆转录酶合成 cDNA。qPCR 采用 ChamQ Blue Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂在 LightCycler480(罗氏)定量 PCR 仪上运行,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量或 DNA 片段相对丰度,所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列列表

引物名称	引物序列 5'-3'
DKK1	正向:TCTCTATGAGGGCGGGAACA
	反向:TTTCGGCAAGCCAGACAGAT
TET1	正向:CCACGTCCTGCCACTATACC
	反向:TGTGTGAACCTGATTTATTGTGGT
TET2	正向:GAGACGGCGGTGATGGTAAT
	反向:CATTCTGAGAACAGCGACGG
TET3	正向:CTCTGTCAACGGCTTCCACT
	反向:GCATGGAGGTCTGGCTTCTT
DKK1 启动子 CpG 岛	正向:CTGAGTATAAAGGCAGCCAGAGGTGG
	反向:CAAACAGGCAAAGGTCAGGAAAAG
Actb 启动子 CpG 岛	正向:AAATGCTGCACTGTGCGG
	反向:CACAGCGGCCACTCGAGCCA
Pgk1 启动子 CpG 岛	正向:CTTTCTGGGCTCAGAGGCTGG
	反向:CAAAATCAACTTATTAATAAAACG

1.6 统计学方法

定量资料采用  $\bar{x}\pm s$  形式表示,多组间比较采用单因素方差分析,双因素资料间比较采用双因素方差分析,组间两两比较采用 Turkey's post-hoc 分析, $P<0.05$  差异有统计学意义,评价相关性采用 Pearson 线性相关分析。

2 结果

2.1 高糖应激增加骨髓间充质干细胞 DKK1 的转录和分泌量

小鼠骨髓间充质干细胞经不同浓度葡萄糖处理后经 RT-qPCR 评估 DKK1 基因转录变化,结果显示经

15,25 和 50 mmol/L 葡萄糖处理 1 周后骨髓间充质干细胞 DKK1 mRNA 较对照组(7.5 mmol/L 葡萄糖)分别增加( $3.03\pm 0.34$ ),( $6.39\pm 0.88$ )及( $7.68\pm 0.48$ )倍,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1a。采用 ELISA 测定培养上清中 DKK1 浓度,对照组上清中 DKK1 浓度为( $47.13\pm 7.61$ )pg/mL,15,25 和 50 mmol/L 高糖应激处理后上清中 DKK1 分别增加至( $206.82\pm 17.11$ ),( $493.13\pm 31.44$ )和( $646.87\pm 43.13$ )pg/mL,与对照组相比差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1b。进一步采用 Pearson 线性相关分析表明,高糖应激对小鼠骨髓间充质干细胞 DKK1

mRNA 转录和蛋白分泌水平均呈正相关, 呈现剂量-

效应关系, 见图 1c 和 d。

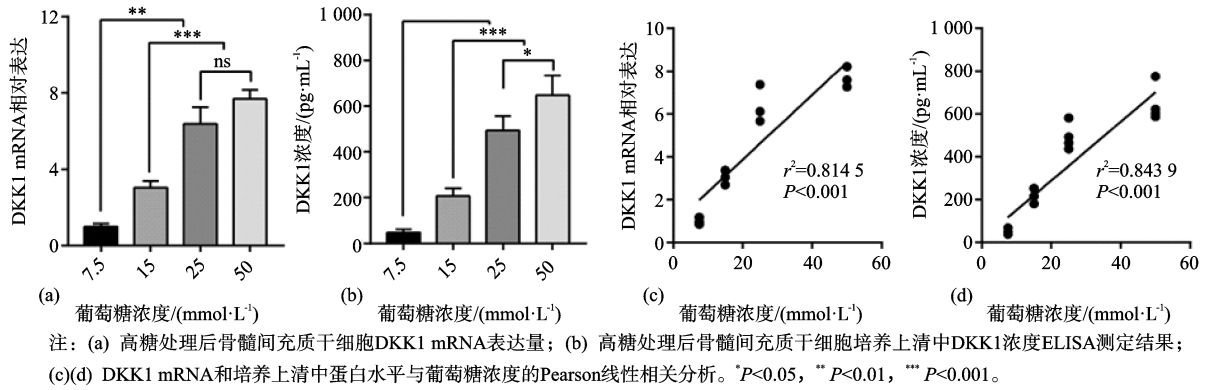


图 1 高浓度葡萄糖增加小鼠骨髓间充质干细胞 DKK1 mRNA 和蛋白的表达

## 2.2 高糖应激下 DKK1 水平增加依赖 DKK1 基因组胞嘧啶羟甲基化修饰

为进一步探索 DKK1 基因在高糖应激下的表观遗传机制, 测定了高糖处理下 DKK1 基因启动子区的 CpG 甲基化和羟甲基化水平, 结果显示高糖处理显著增强了 DKK1 启动子区不被 Hpa II 切割的未修饰 DNA 和被 T4-BGT 处理后不被 Msp I 切割 DNA 的比例 (见图 2a)。进一步定量分析结果表明, 7.5, 15, 25 和 50 mmol/L 葡萄糖培养的骨髓间充质干细胞, 其 DKK1 启动子区 CpG 羟甲基化的比率为  $2.26\% \pm 0.81\%$ ,  $11.26\% \pm 1.06\%$ ,  $15.47\% \pm 3.29\%$  和

$24.53\% \pm 4.39\%$ , 而甲基化比率为  $87.04\% \pm 1.66\%$ ,  $59.34\% \pm 4.65\%$ ,  $47.84\% \pm 4.60\%$  和  $37.45\% \pm 2.08\%$ , 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见图 2b 和 c。为证实羟甲基化在 DKK1 启动子去甲基化和转录激活中的作用, 采用  $10 \mu\text{mol/L}$  的 TETs 抑制剂 Bobcat339 处理骨髓间充质干细胞, 结果显示 Bobcat339 处理后显著降低了高糖诱导的 DKK1 启动子区 CpG 羟甲基化, 同时伴有去甲基化障碍, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见图 2d 和 e。实验结果进一步表明, Bobcat339 能显著抑制高糖应激所致的 DKK1 转录激活和蛋白分泌, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 见图 2f 和 g。

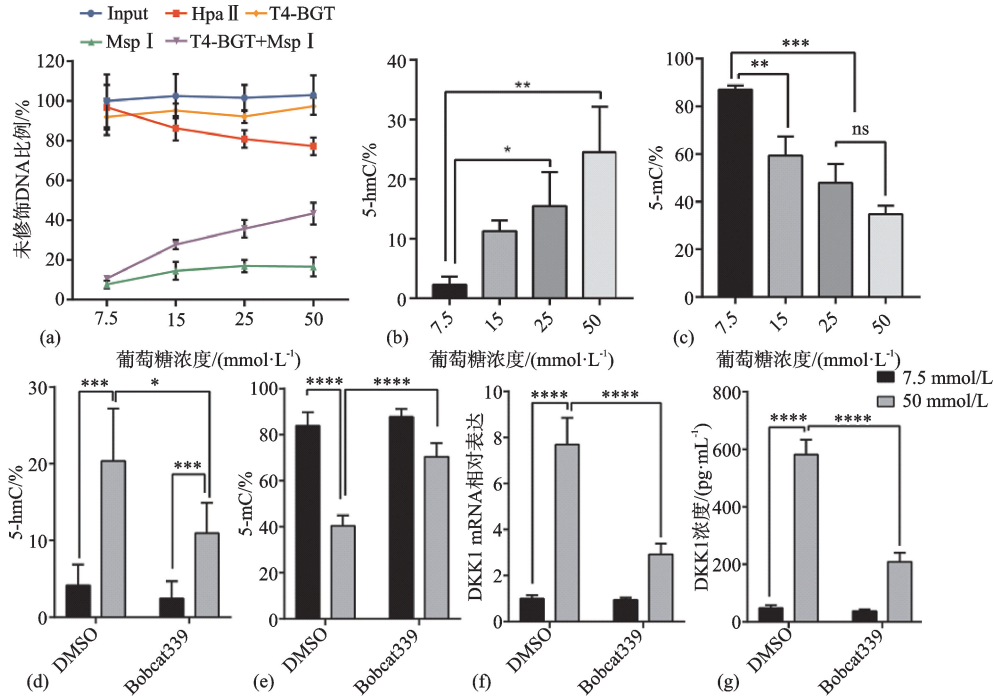


图 2 高糖诱导的骨髓间充质干细胞 DKK1 表达依赖胞嘧啶羟甲基化修饰



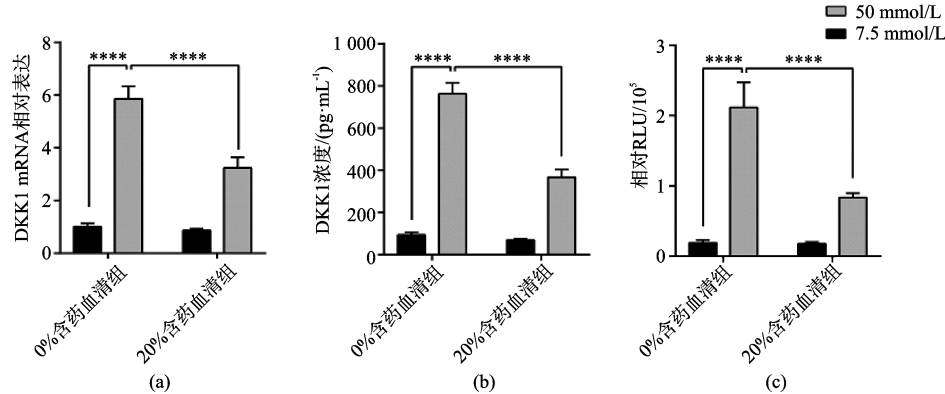
2.3 加味六味地黄汤减轻高糖应激所致的骨髓间充质干细胞 DKK1 基因活化

基于本课题组前期加味六味地黄汤能减轻糖尿病性骨质疏松的研究基础,笔者进一步探索了加味六味地黄汤是否能抑制 DKK1 的转录再激活。结果显示添加 20% 的加味六味地黄汤含药血清处理 48 h 可以显著抑制 50 mmol/L 葡萄糖诱导的 DKK1 转录上调,同时显著降低培养上清中 DKK1 的浓度(图 3a 和 b)。为进一步验证加味六味地黄汤是否直接影响 DKK1

基因的启动子区,采用荧光素酶报告基因系统评价了加味六味地黄汤含药血清对 DKK1 启动子活性的影响,结果显示 50 mmol/L 的高糖处理显著增强 DKK1 启动子活性,而加味六味地黄汤含药血清显著抑制了高糖诱导的 DKK1 启动子活性,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见图 3c。

2.4 加味六味地黄汤选择性抑制 DKK1 的胞嘧啶羟甲基化

鉴于胞嘧啶羟甲基化在 DNA 去甲基化和表观遗传

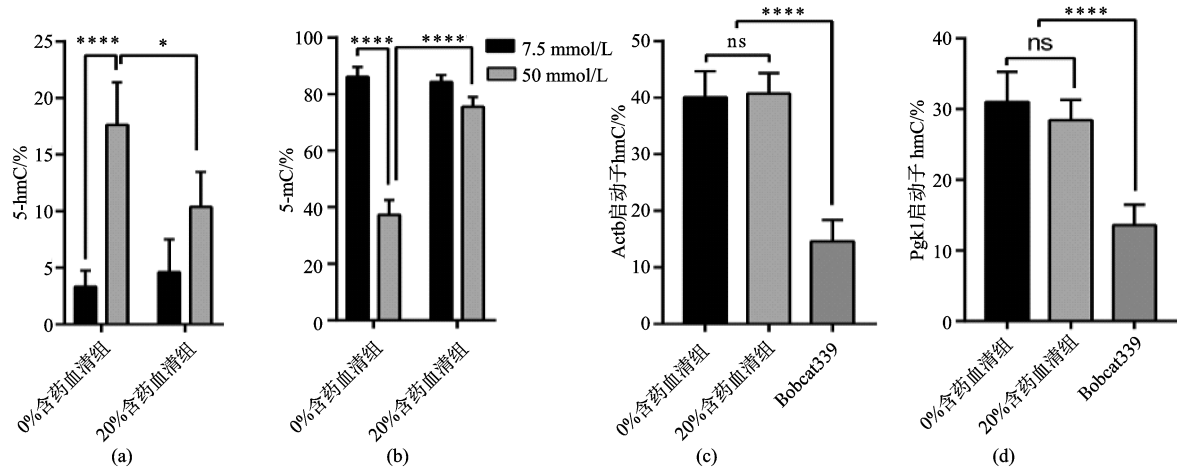


注: (a) 加味六味地黄汤含药血清处理对高糖应激下DKK1转录水平的影响; (b) 加味六味地黄汤对骨髓间充质干细胞DKK1分泌量的影响; (c) 双荧光素酶报告基因系统测定DKK1启动子转录活性。\*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图 3 加味六味地黄汤对高糖应激下 DKK1 表达的影响

重编程中的关键作用,测定了加味六味地黄汤含药血清对 DKK1 基因启动子区甲基化及羟甲基化的影响。结果显示在 50 mmol/L 高糖情况下,加味六味地黄汤含药血清使骨髓间充质干细胞 DKK1 启动子区羟甲基化水平由  $17.63\% \pm 3.75\%$  下降至  $10.36\% \pm 3.11\%$ ,同时使该区域维持在甲基化状态(见图 4a 和 b)。为了验证加

味六味地黄汤是选择性抑制 DKK1 启动子区羟甲基化还是非选择性抑制 DNA 羟甲基化,选择 Actb 和 Pgk1 基因的启动子区测定了其 CpG 羟甲基化水平,结果显示与 TETs 抑制剂 Bobcat339 不同,加味六味地黄汤含药血清对 Abct 和 Pgk1 基因启动子区的羟甲基化水平未见显著影响(见图 4c 和 d)。



注: (a)(b) 20%加味六味地黄汤含药血清处理后对高糖状态下(7.5 mmol/L vs 50 mmol/L) DKK1基因胞嘧啶羟甲基化和甲基化比例的影响; (c) 加味六味地黄汤处理后DKK1基因CpG岛维持甲基化状态; (d) 20%加味六味地黄汤含药血清处理对小鼠骨髓间充质干细胞Actb和Pgk1启动子CpG岛羟甲基化比率的影响。\* $P<0.05$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

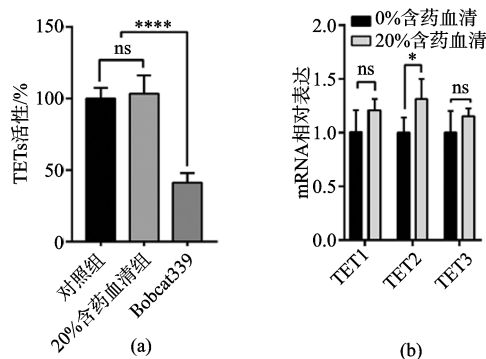
图 4 加味六味地黄汤对 DKK1 启动子区羟甲基化的选择性影响

2.5 加味六味地黄汤对 TETs 活性未见显著直接影响

TETs 活性实验结果显示,50  $\mu$ mol/L 的 Bobcat339 在细胞核裂解产物中可显著抑制 TETs 活性(相对活性为  $41.21\% \pm 6.72\%$ ),差异有统计学意义( $P<$

$0.0001$ ),而加味六味地黄汤对 TETs 的活性没有显著影响(相对活性为  $103.21\% \pm 12.89\%$ ),见图 5a。进一步通过 RT-qPCR 研究发现,添加 20% 加味六味地黄汤含药血清能略提高 TET2 的转录水平,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),对 TET1 和 TET3 的转录水

平未见显著影响,见图 5b。未发现加味六味地黄汤含药血清对 TETs 的活性和转录有直接抑制作用。



注: (a) 加味六味地黄汤含药血清和Bobcat339对TETs活性的影响; (b) 加味六味地黄汤对小鼠骨髓间充质干细胞TET1、TET2和TET3转录水平的影响。<sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P<0.0001$ 。

图5 加味六味地黄汤含药血清对 TETs 酶活性和转录水平的影响

### 3 讨论

中医学认为糖尿病性骨质疏松症是多脏腑功能失调导致的肌肉骨骼疾病,属于“消渴”合并“骨痿”范畴。在关于消渴的论述中,《仁斋直指方论》曰“热伏于下,肾虚受之,腿膝枯细,骨节酸痛……”,《医镜》又云“消肾之症,骨瘦腿疼,宜滋肾水”等,从症状描述似骨痿、骨痹。本病发病始于消渴,形成于骨痿,病位在骨与关节,病变的脏腑主要与脾、肝、肾相关,尤以肾为关键。肾为先天之本,主藏精,精生髓,髓可养骨,骨为肾所主。肾精虚衰,骨髓化源不足,骨失所养,则骨体枯槁、骨质脆弱而发为骨痿。且肝肾同源,肾虚日久必损及肝,而肝肾亏虚,导致骨肉相离,筋骨解堕,骨痿更盛。中医学认为骨痿的基本病机以肾精亏虚为主,但常夹杂肝虚、脾虚、血瘀等其他因素。糖尿病性骨质疏松症多为糖尿病久病患者,故本病虽以肝肾亏虚为主,但日久阴虚及阳,久病入络,本质乃本虚标实之疾患,其发病非单纯的线性因果关系,而是多虚夹瘀、虚中有实、阴病及阳的关系。故在治疗上,主要以补肝益肾、调整阴阳为主,以达到强壮筋骨之治疗目的。本研究所用加味六味地黄汤是在六味地黄经典方基础上加用淫羊藿、牛膝、当归。加用淫羊藿,走肝肾二经,补命门、益精气、强筋骨,其辛甘性温,作为反佐药,又有阳中求阴之意。本病为消渴的并发症,久病入络,因此加用当归,既可养血补阴,又可活血化瘀通络。再加一味牛膝,性味苦甘酸平,归肝肾经,兼顾补肝肾、强筋骨和逐瘀通络之效。诸药合用,既可补益肝肾、调整阴阳,又可兼顾活血通络止痛。

本研究发现,加味六味地黄汤可抑制骨髓间充质干细胞的 DKK1 胞嘧啶羟甲基化。真核生物活跃转录基因的启动子和转录调控区常含有非甲基化胞嘧啶富集的高 GC 区,称之为 CpG 岛<sup>[6]</sup>。当基因表达关闭时,该基因 CpG 岛被甲基化,发生异染色质化转化为非开放

染色质;而已关闭基因的再激活通常需要 CpG 岛重新去甲基化<sup>[7-8]</sup>。与组蛋白甲基化修饰可以直接去甲基化不同,DNA 胞嘧啶甲基化无法直接脱去甲基,需要先将甲基化的胞嘧啶(5-mC)残基由 TETs 催化转化为 5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC),进而再转化为未修饰胞嘧啶残基<sup>[9-10]</sup>。由此可见,CpG 岛胞嘧啶羟甲基化是多数已沉默基因恢复表达时依赖的关键表观遗传机制之一,在多种生理和病理过程中具有重要意义。

DKK1 是一种负调控 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路的分泌型蛋白,在肿瘤引起的溶骨性病变和多种类型的骨质疏松中均可以发现 DKK1 表达量增高<sup>[11-12]</sup>。鉴于此,目前认为 DKK1 是一个治疗骨质疏松的潜在靶点,中和 DKK1 的单克隆抗体目前已进入临床试验<sup>[13]</sup>。本研究在前期已发现中药方剂加味六味地黄汤能减轻糖尿病性骨质疏松症的基础上,采用体外细胞培养模型初步验证了加味六味地黄汤含药血清可以抑制高糖应激所诱导的 DKK1 表达,这与已有的少量报告结果一致<sup>[14]</sup>。考虑到羟甲基化在基因转录再活化中的关键作用,探究加味六味地黄汤影响 DKK1 启动子区 CpG 岛羟甲基化的可能,发现该药抑制了 DKK1 启动子区 CpG 羟甲基化,继而导致该区域难以完成胞嘧啶去甲基化而维持在不易转录的状态,最终限制了高糖应激诱导的 DKK1 表达,这一发现为诠释加味六味地黄汤防治糖尿病性骨质疏松症的机制提供了新的视角。

胞嘧啶羟甲基化是在真核生物细胞中维持基因染色质开放的重要机制之一<sup>[15]</sup>,若不加选择地抑制胞嘧啶羟甲基化,则可能产生肿瘤等严重后果<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,加味六味地黄汤对胞嘧啶羟甲基化的抑制作用选择性发生于 DKK1 基因,对其他基因的启动子区羟甲基化无显著抑制作用,这与 TET1/2 抑制剂 Bobcat339 有显著区别。本研究结果还显示加味六味地黄汤含药血清对骨髓间充质干细胞中 TETs 的转录没有抑制作用。这些结果证明加味六味地黄汤对 DKK1 启动子羟甲基化的抑制作用具有一定选择性,规避了在基因组水平抑制羟甲基化所带来的风险。此外,加味六味地黄汤含药血清对 DKK1 基因启动子区胞嘧啶羟甲基化的选择性抑制,揭示了羟甲基化调控的复杂性,值得进一步深入探索。

### 参考文献

- [1] 刘明明,马勇,许海燕,等.加味六味地黄汤治疗肝肾亏虚型糖尿病性骨质疏松症的临床疗效[J].中国中医骨伤科杂志,2022,30(3):12-16.
- [2] YUAN S,ZHANG C,WANG B. Neohesperidin promotes the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs via BMP2-Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Cell Cycle,2022,21(2):187-201.
- [3] HE S C,GUAN Y,WU Y C,et al. DEC1 deficiency results in accelerated osteopenia through enhanced DKK1 activity and

- attenuated PI3KCA/Akt/GSK3 $\beta$  signaling[J]. *Metabolism*, 2021,118:154730.
- [4] VANOVA M M, DAO J, KASACI N, et al. Wnt signaling pathway inhibitors, sclerostin and DKK-1, correlate with pain and bone pathology in patients with Gaucher disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022,13:1029130.
- [5] FAN M, SHI H, YAO H, et al. Glutamate regulates gliosis of BMSCs to promote ENS regeneration through  $\alpha$ -KG and H3K9/H3K27 demethylation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022,13(1):255.
- [6] QIN W, SCICLUNA B P, VAN DER POLL T. The role of host cell DNA methylation in the immune response to bacterial infection[J]. *Front Immunol*, 2021,12:696280.
- [7] SHEN H X, YANG E S, CONRY M, et al. Predictive biomarkers for immune checkpoint blockade and opportunities for combination therapies[J]. *Genes Dis*, 2019,6(3):232-246.
- [8] 王建勇, 黄诗诗, 金婉君, 等. DNA 甲基化和羟甲基化在帕金森病发病机制中的研究进展[J]. *浙江医学*, 2023,45(3):315-318.
- [9] TAIRA A, PALIN K, ANNA K K, et al. Vitamin C boosts DNA demethylation in TET2 germline mutation carriers[J]. *Clin Epigenetics*, 2023,15(1):7.
- [10] KAASINEN E, KUISMIN O, RAJAMÄKI K, et al. Impact of constitutional TET2 haploinsufficiency on molecular and clinical phenotype in humans[J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):1252.
- [11] LI R, ZHENG C, WANG Q, et al. Identification of an immunogenic DKK1 long peptide for immunotherapy of human multiple myeloma[J]. *Haematologica*, 2021,106(3):838-846.
- [12] 王童瑶, 李思源, 李军, 等. 绝经后女性 2 型糖尿病合并骨质疏松与 DKK1 基因多态性关系的研究[J]. *糖尿病新世界*, 2022,25(7):10-12.
- [13] JANECZEK A A, TARE R S, SCARPA E, et al. Transient canonical Wnt stimulation enriches human bone marrow mononuclear cell isolates for osteoprogenitors[J]. *Stem Cells*, 2016,34(2):418-430.
- [14] SUN T, YAN Z, CAI J, et al. Effects of mechanical vibration on cell morphology, proliferation, apoptosis, and cytokine expression/secretion in osteocyte-like MLO-Y4 cells exposed to high glucose[J]. *Cell Biol Int*, 2020,44(1):216-228.
- [15] HE C, ZHANG H Y, ZHANG Y X, et al. Cytosine methylations in the promoter regions of genes involved in the cellular oxidation equilibrium pathways affect rice heat tolerance[J]. *BMC Genomics*, 2020,21(1):560.
- [16] AIVALIOTI M M, BARTHOLDY B A, PRADHAN K, et al. PU. 1-dependent enhancer inhibition separates TET2-deficient hematopoiesis from malignant transformation[J]. *Blood Cancer Discov*, 2022,3(5):444-467.
- (收稿日期:2024-01-13)
- 
- (上接第 10 页)
- [15] CAI L, ZHOU M Y, HU S, et al. Umbelliferone inhibits migration, invasion and inflammation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and relieves adjuvant-induced arthritis in rats by blockade of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Am J Chin Med*, 2022,50(7):1945-1962.
- [16] SUN Y, HUANG H, ZHAN Z, et al. Berberine inhibits glioma cell migration and invasion by suppressing TGF- $\beta$ 1/COL11A1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022,625:38-45.
- [17] HU Q, LI L, ZOU X, et al. Berberine attenuated proliferation, invasion and migration by targeting the AMPK/HNF4 $\alpha$ /WNT5A pathway in gastric carcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2018,9:1150.
- [18] 宗世烨, 周静, 蔡伟伟, 等. 小檗碱抑制类风湿关节炎患者的成纤维样滑膜细胞的自噬并促进其凋亡: 基于下调 ROS/mTOR 信号通路[J]. *南方医科大学学报*, 2023,43(4):552-559.
- [19] HUI W, ZHAO C, BOURGOIN S G. Differential effects of inhibitor combinations on lysophosphatidic acid-mediated chemokine secretion in unprimed and tumor necrosis factor- $\alpha$ -primed synovial fibroblasts [J]. *Front Pharmacol*, 2017,8:848.
- [20] FARKHONDEH T, MEHRPOUR O, BUHRMANN C, et al. Organophosphorus compounds and MAPK signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(12):4258.
- [21] IJOMONE O M, IROEGBU J D, ASCHNER M, et al. Impact of environmental toxicants on p38-and ERK-MAPK signaling pathways in the central nervous system[J]. *Neurotoxicology*, 2021,86:166-171.
- [22] ROVIDA E, TUSA I. Targeting MAPK in cancer 2.0[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(10):5702.
- [23] LI J Z, CHEN Z H, LIAO H, et al. Anti-osteogenic effect of Danshensu in ankylosing spondylitis: an in vitro study based on integrated network pharmacology[J]. *Front Pharmacol*, 2021,12:772190.
- [24] SHARMA A R, JAGGA S, CHAKRABORTY C, et al. Fibroblast-like-synoviocytes mediate secretion of pro-inflammatory cytokines via ERK and JNK MAPKs in ti-particle-induced osteolysis [J]. *Materials (Basel)*, 2020,13(16):3628.
- [25] CZARNECKA A M, SYNORADZKI K, FIRLEJ W, et al. Molecular biology of osteosarcoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2020,12(8):2130.
- [26] LEONE G M, MANGANO K, PETRALIA M C, et al. Past, present and (foreseeable) future of biological anti-TNF- $\alpha$  therapy[J]. *J Clin Med*, 2023,12(4):1630.
- (收稿日期:2024-01-02)