

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.05.014

实验研究

补肾舒脊颗粒含药血清对人骨髓间充质干细胞 Wnt5a、 β -catenin mRNA 及蛋白表达的影响

鄢泽然¹, 史光耀², 王晓瞳¹, 张岚¹, 阎小萍^{1*}

(1. 中日友好医院, 北京市朝阳区樱花东街 2 号, 100029; 2. 内蒙古医科大学)

摘要 目的 探讨补肾舒脊颗粒延缓异位骨化的可能作用机制。方法 体外培养人骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 分为空白组、模型组、对照组及中药高、中、低剂量组。空白组加入基础培养基 (3.8 ml) + 5% 正常大鼠血清 (0.2 ml); 模型组加入诱导培养基 (4.8 ml) + 5% 正常大鼠血清 (0.2 ml); 西药组加入诱导培养基 (3.8 ml) + 5% 洛索洛芬钠含药血清 (0.2 ml); 中药高、中、低剂量组分别加入诱导培养基 (3.8 ml) + 5% 补肾舒脊颗粒含药血清 (0.2 ml)。28 天后通过逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和免疫印迹试验 (Western blot) 检测 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 及蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组 Wnt5a、 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 对照组和中药各剂量组 Wnt5a、 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与对照组比较, 中药高剂量组 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达降低, 中药中剂量组 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与中药低、中剂量组比较, 中药高剂量组 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与中药低剂量组比较, 中药中剂量组 Wnt5a 蛋白表达降低, 中药高剂量组 β -catenin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。结论 补肾舒脊颗粒可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 及蛋白的表达, 从而起到延缓强直性脊柱炎异位骨化的作用。

关键词 强直性脊柱炎; 补肾舒脊颗粒; 异位骨化; Wnt5a; β -catenin; Wnt/ β -catenin 信号通路

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是以骶髂关节和脊柱慢性炎症为主的全身性疾病, 病因及发病机制至今不明, 其特征性病理变化为肌腱、韧带附着点炎症, 导致纤维性和骨性强直^[1]。临床表现为腰背僵硬或疼痛, 活动后可以缓解; 晚期发生脊柱强直、畸形以致严重功能受损^[2]。异位骨化是 AS 常见的一种病理性骨形成, 常见于关节和关节外组织, 分为骨连续和骨非连续, 最终发展至关节结构破坏, 功能丧失^[3]。补肾舒脊颗粒是以骨碎补为主的中药颗粒成方, 前期研究^[4-6]结果显示, 补肾舒脊颗粒内服对 AS 具有明显疗效, 能显著改善患者疼痛、关节肿胀、晨僵时间, 脊柱活动度, 且能抑制 AS 成纤维细胞纤维化, 延缓异位骨化。

激活的 Wnt 信号通路有助于骨赘形成, 对于

骨重塑的合成代谢模式起重要作用, 在间充质干细胞原生质膜的受体上结合 Wnt 蛋白可以诱导其分化为成骨细胞系, 从而促进骨形成^[7]。Wnt 信号传导途径有 3 个, 其中 Wnt/ β -catenin 信号转导通路在 AS 异位骨化中起主要作用^[8-9]。文献报道 Wnt5a、 β -连锁蛋白 (β -catenin) 对 AS 异位骨化存在确定的影响^[10]。本实验拟观察补肾舒脊颗粒对 Wnt/ β -catenin 信号通路上 Wnt5a、 β -catenin 表达的影响, 探讨补肾舒脊颗粒抑制异位骨化的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞

SPF 级健康 SD 雄性大鼠 40 只, 8 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem

基金项目: 国家自然科学基金 (81373562)

* 通讯作者: yanxiaoping1688@126.com, (010) 84205152

cells, BMSCs), 购自 Sciencell 公司, 货号: 7500。

1.2 药品

补肾舒脊颗粒组成: 骨碎补 10 g, 狗脊 6 g, 杜仲 6 g, 桂枝 6 g, 羌活 6 g, 鹿角霜 4 g, 延胡索 7 g, 秦艽 7 g, 续断 7 g, 青风藤 9 g。制成颗粒后每袋 6 g, 含生药量 22.67 g, 由中日友好医院药学部生产, 批号: 140601。洛索洛芬钠片 [乐松, 每片 60 mg, 第一三共制药(上海)有限公司, 批号: SN010LA]。

1.3 主要试剂和仪器

基础培养基: 骨髓间充质干细胞培养基 (MSCM) (货号: 7501) + 青霉素/链霉素溶液 (货号: 0503) + 5% 胎牛血清 (货号: 0025) + 间充质干细胞生长因子 (MSCGS, 货号: 7552); 诱导培养基: 骨髓间充质干细胞成骨分化培养基 (MODM, 货号: 7531) + 青霉素/链霉素溶液 (货号: 0503) + 5% 胎牛血清 (货号: 0025) + 间充质干细胞成骨分化因子 (MODS, 货号: 7532-5), 均为 Sciencell 公司产品。0.25% 胰蛋白酶 (Thermo 公司, 货号: R001100); Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen 公司, 货号: 15596026); iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad 公司, 货号: 1708890); Fast Start Universal SYBR Green Master [Rox] (Roche 公司, 货号: 4913850001); DEPC 水 (Solarbio 公司, 货号: R1600); TEMED 性生物工程 (上海) 有限公司, 货号: A610508]; Total protein Extraction Kit (ProMad 公司, 货号: SJ-200501); BCA 蛋白测定试剂盒 (北京普利来基因技术有限公司, 货号: P1511); 一抗: Wnt5a 抗体 (货号: ab72583)、 β -catenin 抗体 (货号: ab16051) 均为 Abcam 公司产品; 茜素红 (北京索莱宝公司, 货号: G1450)。荧光倒置显微镜 (Olympus 公司, 型号: CKX41); 酶联免疫检测仪 (Molecular Devices 公司, 型号: Spectra Max® M2° SMP500-17540-JIZP); 电泳仪 (型号: 165-3301)、转膜仪 (型号: 170-3930) 均为 Bio-Rad 公司产品; CO₂ 培养箱 (Thermo 公司, 型号: 3111); 离心机 (Eppendorf 公司, 型号: 5804R); 实时荧光 PCR 仪 (Invitrogen 公司, 型号: ABI7500); 紫外分光光度计 (南京五义科技有限公司, 型号: OD-4000)。

1.4 含药血清制备

SD 大鼠 40 只适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分为补肾舒脊颗粒高、中、低剂量组, 对照

组及正常组, 每组 8 只。补肾舒脊颗粒高、中、低剂量组大鼠给予补肾舒脊颗粒灌胃, 剂量分别为 3.7、1.85、0.93 g/(kg·d)。对照组给予洛索洛芬钠悬液 18.5 mg/(kg·d) 灌胃。正常组给予生理盐水灌胃。均每日 2 次, 每次 1 ml, 连续 7 天。末次给药后 1h, 经腹主动脉取血, 室温静置 2h 后, 2500 r/min 离心 15 min 分离血清。同组混匀, 56℃ 水浴 30 min 灭活, 微孔滤膜过滤除菌, -80℃ 保存。灌胃剂量参照《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》^[1]。

1.5 细胞培养

将冻存的人 BMSCs 进行复苏, 从液氮中取出, 迅速放入 37℃ 水浴中, 于 1 min 内溶解, 在无菌状态下将细胞移入离心管, 加入 20 ml 完全培养液, 取 100 μ l 进行台盼蓝计数, 其余进行离心。1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 10 ml 基础培养基后, 调整细胞密度为 3×10^5 /ml, 接种于包被后的 T-25 培养瓶中, 置 37℃ 温箱静置培养, 次日更换一次培养液, 继续培养, 观察生长情况。待细胞铺满培养瓶 60% ~ 70% 时, 用 0.25% 胰酶进行消化, 收集细胞后离心并台盼蓝计数, 后将细胞种于两个 T-75 培养瓶中, 置 37℃ 温箱静置培养, 次日更换一次培养液, 继续培养, 观察生长情况。待细胞铺满培养瓶时, 进行细胞传代。

1.6 细胞分组及给药

人 BMSCs 扩增培养后, 接种于包被后的 6 孔板上, 分为空白组、模型组、西药组及中药高、中、低剂量组, RT-PCR 实验每组 9 个样本, Western 实验每组 6 个样本, 每个样本设 3 个复孔。使用基础培养基进行培养。培养 4 天后细胞长至 95% ~ 100% 换液。空白组加入基础培养基 (3.8 ml) + 5% 正常大鼠血清 (0.2 ml) 共同培养; 模型组加入诱导培养基 (4.8 ml) + 5% 正常大鼠血清 (0.2 ml) 共同培养; 西药组加入诱导培养基 (3.8 ml) + 5% 洛索洛芬钠含药血清 (0.2 ml); 中药高、中、低剂量组分别加入诱导培养基 (3.8 ml) + 含不同生药量 5% 含药血清 (0.2 ml) 共同培养。每 3 ~ 4 天换液 1 次, 培养至 28 天。行茜素红染色, 鉴定成骨诱导。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 BMSCs 中 Wnt5a、 β -catenin mRNA 表达 使用 Trizol 法总 RNA 提取试剂盒, 按照常规操作顺序提取 BMSCs 总 RNA, 紫外分光光度计检测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 计算总 RNA 的浓度及纯度, λ 260/

$\lambda 280$ 为 1.7 ~ 2.0, 达到了进行逆转录—聚合酶链反应 (RT-PCR) 的要求。以经 DNase 处理的总 RNA 为模板, 使用 iScript™ cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒进行 cDNA 的合成。参照说明书采用 20 μ l 体系进行逆转录: 加入 1 μ g 的样本 RNA、4 μ l 的逆转录混合物、1 μ l 的逆转录酶, 用无核酸酶的水补足 20 μ l 反应体系。添加完试剂后, 轻轻混匀, 轻微离心使反应体系聚集在 PCR 管底部, 置 PCR 仪上进行逆转录反应。反应结束后, 产物贮于 -20℃ 备用。反应条件: 25℃ 5 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min, 4℃ 恒温保持。反应于 PCR 仪中。合成 cDNA 置于 -20℃ 保存备用。

在 0.2 ml 离心管内, 依次加入 RT-PCR 反应试剂: cDNA 模板 1 μ l、SYBR® Green Master Mix 12.5 μ l 及 Wnt5a、 β -catenin 上下游引物各 1 μ l, 用 DEPC 水补足 25 μ l, 混匀后立即置于实时荧光 PCR 仪中, 扩增条件: 95℃ 预变性 2min, 两步法循环反应 (95℃ 10s, 60℃ 1min) 40 个循环。每组 9 个样本, 每个样品基因行 3 个复孔平行实验。引物由 Invitrogen 公司合成, Wnt5a: F: 5'-CAACTG-GCAGGACTTTCTCA-3', R: 5'-TTCTTTGATGCCT-GTCTTCG-3'; β -catenin: F: 5'-ACAACTGTTTT-GAAAATCCA-3', R: 5'-CGAGTCATTGCATACT-GTCC-3'; β -actin: F: 5'-GAGGGAAATCGTGCCT-GAC-3', R: 5'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3'。结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

1.7.2 BMSCs 中 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达 采用免疫印迹法检测, 用细胞裂解液裂解不同培养条件下的细胞样品, 提取总蛋白, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒操作说明, 测定蛋白浓度。5 × Loading buffer 混合 95℃ 煮沸 5 min 充分变性蛋白。10% SDS-PAGE 凝胶分离样品, 400mA 恒流 240min 转至 PVDF 膜, 以相应的一抗和二抗孵育, 将膜置于凝胶成像系统中, ECL 化学发光后成像。每组 6 个样本, 每个样本重复 3 次。

1.8 统计学方法

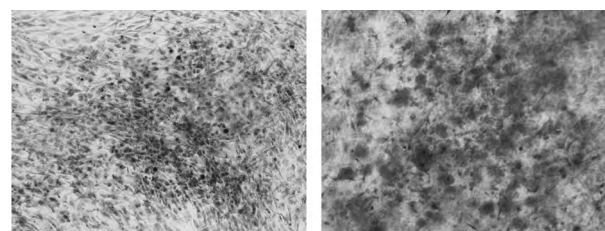
用 SPSS 20.0 统计软件包处理数据, 数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞成骨诱导结果

图 1 示, 行茜红素染色, 空白组骨髓间充质干细胞培养 28 天后未见形成矿化结节, 模型组形成

矿化结节, 说明成骨诱导分化成功。



空白组

模型组

图 1 空白组和模型组骨髓间充质干细胞成骨诱导结果 (茜红素染色, $\times 10$)

2.2 各组 BMSCs 中 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组和中药各剂量组 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与西药组比较, 中药高剂量组 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达降低 ($P < 0.01$); 与中药低、中剂量组比较, 中药高剂量组 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组 BMSCs 中 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Wnt5a mRNA	β -catenin mRNA
空白组	9	0.33 $\pm$ 0.13	0.45 $\pm$ 0.23
模型组	9	5.63 $\pm$ 2.43 **	4.16 $\pm$ 1.78 **
西药组	9	1 * Δ	1 * Δ
中药低剂量组	9	3.04 $\pm$ 0.89 ** Δ	2.54 $\pm$ 0.64 ** Δ
中药中剂量组	9	1.02 $\pm$ 0.22 * $\Delta\Delta$ ▼	2.34 $\pm$ 1.41 ** $\Delta\Delta$
中药高剂量组	9	0.48 $\pm$ 0.13 ** $\Delta\Delta$ ▼▼#	0.55 $\pm$ 0.18 ** $\Delta\Delta$ ▼#

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与西药组比较, $\Delta P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, ▼ $P < 0.05$, ▼▼ $P < 0.01$; 与中药中剂量组比较, # $P < 0.05$

2.3 各组 BMSCs 中 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 西药组及中药各剂量组 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$); 与西药组比较, 中药中剂量组 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与中药低剂量组比较, 中药中剂量组 Wnt5a 蛋白表达降低, 中药高剂量组 β -catenin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 中药高剂量组 Wnt5a 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。中药中剂量组与中药低剂量组间 β -catenin 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组 BMSCs 中 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Wnt5a	β -catenin
空白组	6	0.52 $\pm$ 0.31	0.39 $\pm$ 0.41
模型组	6	0.88 $\pm$ 0.12*	0.79 $\pm$ 0.14*
西药组	6	0.65 $\pm$ 0.11 Δ	0.53 $\pm$ 0.05 Δ
中药低剂量组	6	0.57 $\pm$ 0.01* Δ	0.37 $\pm$ 0.11* Δ $\blacktriangle$
中药中剂量组	6	0.44 $\pm$ 0.04 Δ $\blacktriangledown$	0.39 $\pm$ 0.21 Δ $\blacktriangle$
中药高剂量组	6	0.61 $\pm$ 0.13 Δ	0.48 $\pm$ 0.22 Δ $\blacktriangledown$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与西药组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\blacktriangledown P < 0.05$

3 讨论

AS 患者临床多以腰背疼痛、颈项僵硬不舒为主诉,焦树德教授结合《素问·生气通天论》中“阳气者,精则养神,柔则养筋。开阖不得,寒气从之,乃生大倮”的论述,提出其病机为阳气开阖失司,卫外不固,导致寒气侵袭而引起的脊柱、腰背筋脉挛急不舒^[12]。我们结合临床论治经验及循经辨证思想,认为 AS 病因病机不外乎内外两方面,在内责之肾虚督寒,阳气开阖失司,督脉所循行肌肉筋骨失于濡养;在外当属风寒湿邪乘虚而入,侵袭肾督^[13-15]。督脉循行于脊背通于肾,总督人身之阳气,督脉受寒湿之邪则阳气布化失司,脊柱腰膝失于温煦,故见脊柱僵直不舒、俯仰受限;肾藏精主骨生髓,肾受邪则骨失淖泽,而见四肢骨骼关节拘挛疼痛、畏寒喜暖、得热则舒^[16]。补肾舒脊颗粒为我们临床治疗 AS 肾虚督寒证的经验方化裁而成,方中骨碎补味苦性温,归肝肾经,补肾活血,补肾养肝荣筋,祛寒除湿;狗脊温养肝肾,通调血脉,强腰膝,坚脊骨,利关节;桂枝、杜仲、鹿角霜、续断、秦艽温补肾阳,益气强督,舒脊通脉,祛风寒湿,通利关节;羌活入膀胱经,能“挟脊而行”,祛风散寒除湿。青风藤、延胡索具有通经活络、利节止痛之功。

AS 引起异位骨化的机制是脊柱关节周围的炎症因子促发了炎症级联反应,促使韧带成纤维细胞分化为成骨细胞,产生骨基质,促进羟基磷灰石结晶沉淀,诱导骨形成,构建新的异位骨结构^[9]。Wnt 信号通路在骨形成中扮演着非常重要的角色,异位骨化主要病理生理机制是在骨髓间充质干细胞原生质膜的受体上结合 Wnt 蛋白,诱导其分化为成骨细胞系,从而促进新骨的生成^[17]。Wnt 蛋白可通过激活多种细胞内信号调控多种细胞功能,包括细胞的增殖、分化、凋亡、存活、迁移和极

化^[18-19]。 β -catenin 是介导 Wnt 信号向细胞核传递的重要信号分子。Wnt 蛋白与其受体结合,信号通路被激活,使细胞质内的 β -catenin 含量上升而进入细胞核,并在细胞核内与相关细胞因子结合,启动靶基因转录,引起大量骨质形成。阻断 Wnt 信号通路,减少 β -catenin 生成,可有效阻断新骨形成^[6,20-21]。

本研究结果显示,应用补肾舒脊颗粒含药血清干预 BMSCs 成骨分化过程,中药各剂量组 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 和蛋白表达量较模型组减少,提示补肾舒脊颗粒抑制 AS 异位骨化的机制可能与抑制 Wnt5a、 β -catenin 的表达有关。补肾舒脊颗粒含药血清剂量与 Wnt5a、 β -catenin 表达间存在一定的量效关系,中药高剂量组对 Wnt5a mRNA、 β -catenin mRNA 扩增的抑制作用优于中药中、低剂量组。中药中剂量组对 β -catenin 蛋白表达的抑制作用优于中药高、低剂量组。进一步的量效关系研究需要设立更多不同药物浓度组别,在离体及在体实验中进行组间比较,观察不同剂量的补肾舒脊颗粒对 Wnt/ β -catenin 信号通路上各种细胞因子的影响。我们后续将围绕补肾舒脊颗粒抑制异位骨化的药理药效学机制进一步展开研究,以便更好地探索治疗 AS 的药理机制。

参考文献

- [1] 吴东海,王国春,马丽,等. 临床风湿病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 268-269.
- [2] 张乃峥. 临床风湿病学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 156.
- [3] 聂蕊,李涯松. 强直性脊柱炎异位骨化机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1350-1354.
- [4] 金笛儿,阎小萍. 补肾舒脊颗粒治疗强直性脊柱炎肾虚督寒证的临床研究 [J]. 中国临床医生, 2008, 36(5): 46-49.
- [5] 朱俊岭,阎小萍. 补肾舒脊颗粒对强直性脊柱炎关节液成纤维细胞周期的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(5): 1244-1246.
- [6] 孔维萍,陶庆文,阎小萍,等. 补肾舒脊颗粒治疗强直性脊柱炎近期临床疗效及安全性评价 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(6): 673-677.
- [7] 潘京华,黄浩,查振刚. 间充质干细胞分化中的 Wnt 信号通路 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40): 7144-7149.
- [8] SCHETT G, ZWERINA J, DAVID JP. The role of Wnt proteins in arthritis [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4(9): 473-480.

- [9] GISELA RUIZ H, HEINER A, DENIS P, et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syn- desmophyte formation in patients with ankylosing spondyli- tis [J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(4) : 572-574.
- [10] BRIOLAY A, LENCEL P, BESSUEILLE L, et al. Auto- crine stimulation of osteoblast activity by Wnt5a in response to TNF- α in human mesenchymal stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(3) : 1072-1077.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9) : 1069-1072.
- [12] 焦树德. 大椎的病因病机及其证治新探 [J]. 中医药学刊, 2002, 20(7) : 5-6, 16.
- [13] 孔维萍, 阎小萍. 阎小萍教授治疗强直性脊柱炎的学术思想及其临床经验: 从大椎辨治 注重补肾壮骨 [J]. 中医正骨, 2008, 20(6) : 64-65.
- [14] 李强, 王莉莉. 阎小萍治疗强直性脊柱炎经验 [J]. 中医杂志, 2010, 51(s2) : 148-150.
- [15] 杨学清, 阎小萍. 阎小萍教授对“和法”治疗强直性脊柱炎的认识及组方特色 [J]. 中国临床医生, 2012, 40

(11) : 70-73.

- [6] 阎小萍, 陶庆文, 孔维萍, 等. 补肾强督法为主的综合疗法治疗强直性脊柱炎临床和实验系列研究 [J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(3) : 10-18.
- [7] LUYTEN FP, TYLZANOWSKI P, LORIES RJ. Wnt proteins in arthritis [J]. Nat clin pract, 2008, 4(9) : 473-480.
- [8] LOGAN CY, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 781-810.
- [9] KIKUCHI A, YAMAMOTO H, SATO A, et al. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases [J]. Acta Physiol(Oxf), 2012, 204(1) : 17-33.
- [10] KIMELMAN D, XU W. beta - catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective [J]. Oncogene, 2006, 25(57) : 7482-7491.
- [11] MAHER MT, MO R, FLOZAK AS, et al. Beta-catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from beta-catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling [J]. PloS One, 2010, 5(4) : e10184.

Effect of *Bushen Shuji Granules* (补肾舒脊颗粒) Drug Containing Serum on mRNA and Protein Expressions of Wnt5a and β -catenin in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

YAN Zeran¹, SHI Guangyao², WANG Xiaotong¹, ZHANG Lan¹, YAN Xiaoping¹

(1. China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029; 2. Inner Mongolia Medical University)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Bushen Shuji Granules* (补肾舒脊颗粒, BSG) in delaying heterotopic ossification. **Methods** Human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured in vitro and divided into blank group, model group, control group and Chinese medicine high, medium and low dose groups. The blank group was cultured with basal medium (3. 8 ml) + 5% normal rat serum (0. 2 ml); the model group was cultured with induction medium (4. 8 ml) + 5% normal rat serum (0. 2 ml); the control group was cultured with induction medium (3. 8 ml) + 5% loxoprofen sodium containing serum (0. 2 ml); the Chinese medicine high, medium and low dose groups were cultured with induction medium (3. 8 ml) + 5% BSGs containing serum (0. 2 ml). After 28 days, the mRNA and protein expressions of Wnt5a and β -catenin were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. **Results** Compared with those in the blank group, Wnt5a and β -catenin protein and mRNA expressions in the model group significantly increased ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$). Compared with those in the model group, the mRNA and protein expressions of Wnt5a and β -catenin in the control group and Chinese medicine high, medium and low dose groups decreased ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$); compared with those in the control group, the mRNA expressions of Wnt5a and β -catenin in Chinese medicine high dose group decreased, while the protein expressions of Wnt5a and β -catenin in Chinese medicine medium dose group decreased ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$); compared with those in Chinese medicine low and medium dose groups, the mRNA expressions of Wnt5a and β -catenin in the high dose group decreased ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$). Compared with those in Chinese medicine low dose group, the Wnt5a protein expression in the medium-dose group decreased, and the β -catenin protein expression in the high-dose group increased ($P < 0. 05$). **Conclusion** BSG may inhibit the mRNA and protein expressions of Wnt5a and β -catenin through the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which can delay the heterotopic ossification of ankylosing spondylitis.

Keywords ankylosing spondylitis; *Bushen Shuji Granules* (补肾舒脊颗粒); heterotopic ossification; Wnt5a; β -catenin; Wnt/ β -catenin signaling pathway

(收稿日期: 2017 - 03 - 13; 修回日期: 2017 - 12 - 05)

编辑: 王利芬