

# Orexin-1 受体抑制剂对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响<sup>\*</sup>

张丽媛, 纳青青, 吴天秀

(广东医科大学解剖学教研室, 湛江 524023)

**摘要** 目的 探讨 orexin-1 受体抑制剂对骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖与成骨分化的影响。方法 提取 SD 大鼠 BMSCs 并鉴定, 配制  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup> 不同浓度的 orexin-1 受体抑制剂溶液, 分别与第 3 代 BMSCs 共培养后, 应用噻唑蓝(MTT)法检测 orexin-1 受体抑制剂对 BMSCs 增殖的影响。对硝基苯磷酸盐法和双抗体两步夹心酶联免疫吸附法检测碱性磷酸酶和骨钙素, 实时荧光定量 PCR 法检测成骨分化相关基因 Runx2、Col1a1 mRNA。结果 orexin-1 受体抑制剂最佳促 BMSCs 增殖浓度为  $1 \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup>。  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup> orexin-1 受体抑制剂作用 3, 5, 7 d 能升高 BMSCs 胞浆内碱性磷酸酶表达, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而且这种作用在第 5 天达到高峰。  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup> orexin-1 受体抑制剂作用 7 d 可使骨钙素含量升高( $P < 0.05$ )。  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup> orexin-1 受体抑制剂上调 Runx2、COL1A1 mRNA 表达。结论 orexin-1 受体抑制剂可促进 BMSCs 增殖, 同时促进其向成骨细胞方向分化, 促进 BMSCs 表达碱性磷酸酶刺激骨钙素的分泌。

**关键词** orexin-1 受体抑制剂; 骨髓间充质干细胞; 碱性磷酸酶; 骨钙素

中图分类号 R961

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1103-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.004

## Effects of Orexin-1 Receptor Inhibitor on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

ZHANG Liyuan, NA Qingqing, WU Tianxiu (Anatomy Teaching and Research Section, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

**ABSTRACT Objective** To observe the effects of orexin-1 receptor inhibitor on proliferation and estrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were isolated and cultured from Sprague-Dawley rats, and orexin-1 receptor inhibitor was prepared to different concentration of solutions:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>. Then, the cells at passage 3 were cultured in orexin-1 receptor inhibitor solutions. The cell growth, alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion were measured by MTT, PNPP and ELISA, respectively. The mRNA expression levels of Runx2 and COL1A1 were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The best concentration of orexin-1 receptor inhibitor for the proliferation of BMSCs was  $1 \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup>. Orexin-1 receptor inhibitor promoted the proliferation at concentration of  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup> in 3, 5 and 7 days. Orexin-1 receptor inhibitor at concentration of  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup> for 5 days significantly stimulated ALP activity. Orexin-1 receptor inhibitor significantly up-regulated Runx2 and COL1A1 mRNA expression at concentration of  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup> for 5 days ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Orexin-1 receptor inhibitor can promote BMSCs proliferation and stimulated ALP activity and osteocalcin secretion.

**KEY WORDS** Orexin-1 receptor inhibitor; Bone marrow mesenchymal stem cell; Alkaline phosphatase; Osteocalcin

随着人口日益老龄化, 老年性疾病, 特别骨质疏松症的发病率也在不断上升。目前我国有骨质疏松症患者约 9 000 万例, 到 2050 年预计将激增至 2 亿多例, 占我国人口的 13.2%<sup>[1]</sup>。骨质疏松的关键问题就是骨

形成减少, 但目前用于骨质疏松治疗的骨形成促进药, 疗效不确切, 副作用明显, 已成为目前骨质疏松治疗的瓶颈<sup>[2-3]</sup>。orexin 是神经细胞进行相互通讯的一种蛋白。它们被证实调控许多行为, 包括觉醒、食欲、能量消耗和失眠。研究发现, 与自发性日间嗜睡相关的 Orexin 蛋白, 在骨形成中发挥至关重要的作用<sup>[4]</sup>。因此探讨 orexin-1 受体抑制剂对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal cell, BMSCs)的调节作用, 有可能成为治疗骨质疏松的新疗法。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 大鼠 10 只, 1 个月龄, 雌雄各半, 体质

收稿日期 2016-09-08 修回日期 2016-12-01

**基金项目** \* 2014 年广东医学院科研基金资助项目(2XJ1401P); 2015 年湛江市非资助科技攻关计划项目(2015B01083); 2015 年湛江市财政资金科技专项竞争性分配项目(2015A01030)

**作者简介** 张丽媛(1982-), 女, 广东湛江人, 讲师, 硕士, 研究方向: 抗骨质疏松模型和药物研究。电话: 0759-2388576, E-mail: zmdjzly@126.com。

量( $70 \pm 10$ )g,由广东医科大学实验动物中心 SPF 级动物室提供,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0008;实验动物合格证号:2015-0147。实验过程动物处理符合动物伦理学标准。

**1.2 药品与试剂** 低糖达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)(Gibco 公司,批号:11885-084);胎牛血清(Hyclone 公司,批号:SH30559.03);0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)(Gibco 公司,批号:15050-057);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号:OSO-G8120);orexin-1 受体抑制剂(SB408124,英国 Tocris 公司,批号:S154501);wnt3a(R&D 公司,批号:104684);逆转录试剂盒(Takara 公司,批号:DRR047S);PCR 试剂盒(Takara 公司,批号:DRR047S)。

**1.3 仪器与设备** 紫外分光光度计(美国 MJ 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);荧光显微照相系统(日本 Nikon 公司);超纯水系统(美国 Millipore 公司);定量光度仪(德国 eppendorf 公司);PCR 仪(德国 eppendorf 公司);实时定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司)。

**1.4 BMSCs 的提取** 参照文献[5]方法。4 周龄 SD 大鼠,取双侧股骨及胫骨骨髓,置于完全 DMEM 培养瓶,于二氧化碳培养箱内培养。24 h 首次换液,以后每隔 3 或 4 d 换液 1 次。细胞传代:待细胞铺满瓶底,37 ℃ 消化 3 min,按 1:2 或 1:3 传代,以选定的培养基、血清及其适宜浓度进行扩增培养。

**1.5 BMSCs 的鉴定** 用倒置相差显微镜每天观察 BMSCs 生长、增殖情况及形态特征;流式细胞仪检测细胞表面抗原<sup>[6]</sup>。

**1.6 MTT 法检测 orexin-1 受体抑制剂对 BMSCs 体外增殖的影响** 参照文献[7]方法。取 BMSCsP<sub>3</sub> 细胞消化后,以  $1 \times 10^4 \cdot (\text{cm}^2)^{-1}$  细胞加入 96 孔板,次日加药,分为空白对照组和 orexin-1 受体抑制剂组(orexin-1 受体抑制剂浓度为  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>),加药后 24, 48, 72 h,每孔加入 MTT 20 μL,37 ℃ 避光孵育 30 min,4 h 后弃去上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO)100 μL,待结晶充分溶解后,酶标仪 570 nm 波长下检测吸光度值(A 值)。

**1.7 对硝基苯磷酸盐(P-nitrophenyl phosphate, PNPP)法检测 orexin-1 受体抑制剂对 BMSCs 的碱性磷酸酶(ALP)表达影响** 参照文献[8]方法。取 BMSCsP<sub>3</sub> 细胞消化,以  $1 \times 10^4 \cdot (\text{cm}^2)^{-1}$  细胞数加入 96 孔板,次日加药,分为空白对照组、成骨诱导组和 orexin-1 受体抑制剂组(orexin-1 受体抑制剂浓度为  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>),每 3 d 更换一次新鲜培养液和药物。加药 3, 5, 7, 9 d 后,弃去培养液,

磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,每孔加入反应液 150 μL,37 ℃ 避光孵育 30 min,每孔加 0.04 g · mL<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 100 μL 终止反应,用酶标仪在 405 nm 波长下检测其 A 值。

**1.8 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 orexin-1 受体抑制剂对 BMSCs 作用后骨钙素(osteocalcin OCN)表达的影响** 取 BMSCsP<sub>3</sub> 细胞消化后,以  $1 \times 10^4 \cdot (\text{cm}^2)^{-1}$  细胞数加入 48 孔板,次日加药,分组参照“1.7”项。每 3 d 更换一次新鲜的培养液和药物,收集 7 d 内细胞培养液,按 ELISA 试剂盒说明检测 OCN 的含量。

**1.9 orexin-1 受体抑制剂对成骨分化相关基因表达的影响** 参照文献[9]方法。取 BMSCsP<sub>3</sub> 细胞消化,  $3 \times 10^5 \cdot (\text{cm}^2)^{-1}$  种于 6 孔板,次日加药。分组:空白对照组、Wnt3a 组( $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 orexin-1 受体抑制剂组(浓度为  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>)。每 3 d 更换一次新鲜的培养液和药物。收集处理样品后,将样本管放入紫外分光光度计,在 260 nm 波长处读取 A 值。A 值×稀释倍数,即得 RNA 浓度( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),在 280 nm 处测 A 值,计算  $A_{260}/A_{280}$  ( $1.7 < A_{260}/A_{280} < 2.1$  的样本可用于 PCR 反应)。

**1.10 统计学方法** 采用 SPSS18.0 版统计软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各组间采用完全随机单因素方差分析,样本均数间两两比较采用 t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 形态观察及鉴定

**2.1.1 形态** BMSCs 生长良好,呈旋涡状。见图 1。

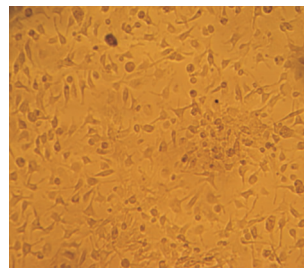


图 1 大鼠 BMSCs 培养 14 d 形态(×100)

**Fig.1 Morphology of BMSCs at 14 d after culture (×100)**

**2.1.2 流式细胞检测** 结果 P<sub>4</sub> 代大鼠 BMSCs 表面抗原 CD<sub>29</sub> 表达阳性,阳性细胞率 > 99%; CD<sub>90</sub> 表达阳性,阳性细胞率 > 99%, CD<sub>45</sub> 表达阴性,阳性细胞率为 3.4%;共表达 CD<sub>29</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>90</sub><sup>+</sup>、CD<sub>45</sub><sup>-</sup> 细胞率为 96.5%,符合 BMSCs 特征。见图 2。

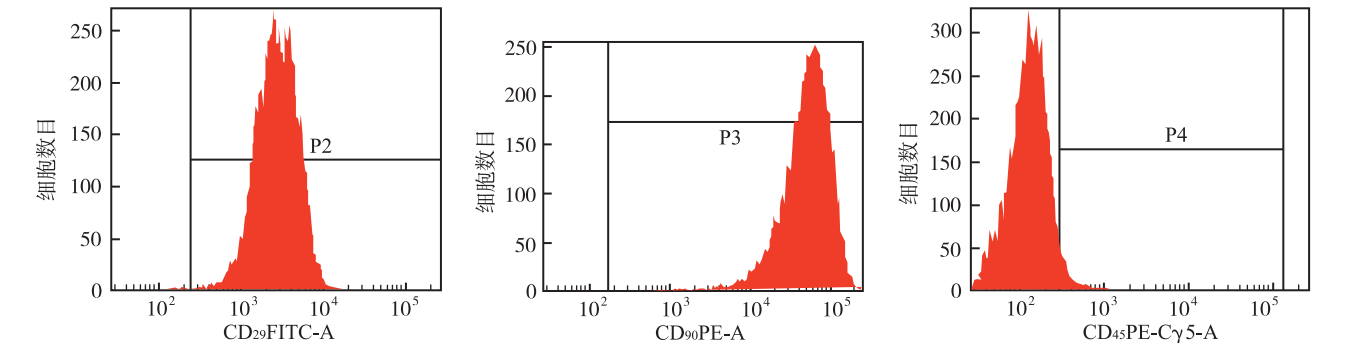


图 2 流式细胞仪检测细胞表面抗原

Fig.2 Detection of cell surface antigens by flow cytometry

**2.2 orexin-1 受体抑制剂对大鼠 BMSCs 增殖的影响**

结果见表 1。表 1 的结果显示,  $10^{-2}, 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组无促进 BMSCs 增殖作用。与空白对照组比较, 第 1 天,  $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组促进 BMSCs 增殖作用, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 第 2 天,  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组促进 BMSCs 增殖差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 第 3 天,  $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组促进 BMSCs 增殖, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。第 1 天,  $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组细胞数量比  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组多 ( $P < 0.05$ )。第 2 天开始,  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组比  $10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂组细胞增殖率高。

$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂作用 3, 5, 7 d 能升高 BMSCs 碱性磷酸酶表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这种促进碱性磷酸酶表达的作用在第 5 天达到高峰。

表 2 7 组 BMSCs 碱性磷酸酶活性(A 值表示)

Tab.2 Activity of alkaline phosphatase in seven groups of BMSCs(A value)

$\bar{x} \pm s, n = 6$				$\bar{x} \pm s, n = 7$		
组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	组别	第 3 天	第 5 天
空白对照组	0.421 5±0.041 3	0.422 5±0.002 0	0.447 1±0.017 8	空白对照组	0.32±0.01	0.33±0.01
orexin-1 受体抑制剂组				成骨诱导组	0.30±0.01 <sup>*1</sup>	0.37±0.06 <sup>*1</sup>
$10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.422 5±0.078 3	0.425 2±0.019 0	0.455 5±0.043 4	orexin-1 受体抑制剂组		
$10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.420 0±0.020 5	0.431 0±0.032 0	0.442 1±0.026 2	$10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.30±0.02	0.31±0.03
$10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.430 5±0.015 6	0.512 5±0.037 1 <sup>*1</sup>	0.520 3±0.041 1 <sup>*1</sup>	$10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.32±0.01	0.32±0.01 <sup>*1</sup>
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.429 7±0.065 3	0.461 9±0.035 5	0.492 5±0.009 7 <sup>*1</sup>	$10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.35±0.06 <sup>*1</sup>	0.38±0.02 <sup>*1</sup>
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.433 1±0.052 4 <sup>*1</sup>	0.477 5±0.088 6 <sup>*1</sup>	0.471 2±0.023 2 <sup>*1</sup>	$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.35±0.01 <sup>*1</sup>	0.37±0.01 <sup>*1</sup>
与空白对照组比较, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.35±0.00 <sup>*1</sup>	0.37±0.01 <sup>*1</sup>
Compared with blank control group, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				组别	第 7 天	第 9 天
空白对照组				空白对照组	0.32±0.02	0.31±0.02
orexin-1 受体抑制剂组				成骨诱导组	0.42±0.02 <sup>*1</sup>	0.39±0.02 <sup>*1</sup>
$10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				orexin-1 受体抑制剂组		
$10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				$10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.33±0.01	0.32±0.01
$10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				$10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.30±0.03 <sup>*1</sup>	0.30±0.01
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				$10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.36±0.00 <sup>*1</sup>	0.32±0.01
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.36±0.01 <sup>*1</sup>	0.31±0.01
与空白对照组比较, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.36±0.02 <sup>*1</sup>	0.31±0.02
Compared with blank control group, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				与空白对照组比较, <sup>*1</sup> $P < 0.05$		
				Compared with blank control group, <sup>*1</sup> $P < 0.05$		

**2.3 orexin-1 受体抑制剂对 BMSCs 碱性磷酸酶表达的影响**

结果见表 2。与空白对照组比较, 成骨诱导组第 3 天抑制碱性磷酸酶表达, 第 5 天促进碱性磷酸酶表达, 第 7 天达到高峰。  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂作用 7 d 抑制细胞碱性磷酸酶的表达 ( $P < 0.05$ )。

**2.4 orexin-1 受体抑制剂对大鼠 BMSCs 骨钙素的影响**

结果见表 3。经成骨诱导液诱导 7 d, BMSCs 分泌骨钙素比空白对照组多; 与空白对照组比较,  $10^{-2}, 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂处理, 差异无统计学意义;  $10^{-4}, 10^{-5}$ ,

$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 orexin-1 受体抑制剂处理 BMSCs 7 d, 骨钙素分泌增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 3 7 组 BMSCs 分泌骨钙素检测值  
Tab.3 Osteocalcin secretion in seven groups of BMSCs

组别	骨钙素浓度 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s, n = 6$
空白对照组	0.712 2±0.053 0
成骨诱导组	0.815 0±0.047 5 <sup>*1</sup>
orexin-1 受体抑制剂组	
$10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.714 8±0.006 8
$10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.718 2±0.031 9
$10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.077 7±0.099 5 <sup>*1</sup>
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.020 1±0.033 9 <sup>*1</sup>
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.982 2±0.051 56 <sup>*1</sup>

与空白对照组比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$   
Compared with blank control group, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$

2.5 orexin-1 受体抑制剂对成骨分化基因表达的影响 结果见表 4。与空白对照组比较, Wnt3a 上调 Runx2 mRNA、COL1A1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ); orexin-1 受体抑制剂也上调 Runx2 mRNA、COL1A1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 这种作用和 orexin-1 受体抑制剂浓度有相关性。

表 4 5 组 BMSCs 靶基因的表达  
Tab.4 Target gene expression of five groups of BMSCs

组别与浓度	COL1A1 表达	Runx2 表达
空白对照组	1.02±0.22	1.16±0.25
Wnt3a 组	3.12±0.33 <sup>*1</sup>	4.37±0.21 <sup>*1</sup>
orexin-1 受体抑制剂组		
$10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.23±0.14 <sup>*1</sup>	4.11±0.53 <sup>*1</sup>
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.18±0.43 <sup>*1</sup>	4.08±0.78 <sup>*1</sup>
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2.88±0.29 <sup>*1</sup>	2.89±0.51 <sup>*1</sup>

与空白对照组比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$   
Compared with blank control group, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$

3 讨论

Orexin 缺陷可引起发作性睡病——自发性日间嗜睡。因此, orexin 拮抗剂有望治疗失眠症, 其中一些药物已被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市<sup>[10]</sup>。WEI 等<sup>[4]</sup>研究表明, Orexins 缺乏的小鼠会出现骨量降低, MicroCT 分析表明是由于缺乏 Orexins 的小鼠体内成骨细胞数量下降, 同时破骨细胞数量没有变化。血清中 P1NP 水平比正常小鼠下降 30%, CTX-1 不变。

这提示 orexin 是通过影响骨形成而不是骨吸收来导致总骨量的减少<sup>[11-13]</sup>。Orexins 可能在这一过程中发挥促进和阻断骨形成双重作用。在骨骼上, orexins 与另一种蛋白 orexin 受体 1 (OX1R) 相互作用, 降低饥饿激素 ghrelin 的水平。这减慢新成骨细胞生成, 由此阻断局部的骨形成。同时, orexins 还与大脑中 orexin 受体 2 (OX2R) 相互作用, 降低瘦素的循环水平。瘦素是一种已知能够减少骨量, 因此促进骨形成的激素。由此, 通过抑制 OX1R 或激活 OX2R 或许能够预防和治疗骨质疏松症。

本实验结果明确 orexin-1 受体抑制剂有促进 BMSCs 增殖的作用。 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂会抑制 BMSCs 碱性磷酸酶表达,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  orexin-1 受体抑制剂能升高 BMSCs 碱性磷酸酶表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。从第 3, 5, 7, 9 天检测数据发现, 成骨诱导组碱性磷酸酶表达在第 7 天达到高峰; 而 orexin-1 受体抑制剂组碱性磷酸酶表达在第 5 天达到高峰。与空白对照组比较, orexin-1 受体抑制剂处理 7 d, BMSCs 分泌的骨钙素增多, orexin-1 受体抑制剂各浓度组骨钙素分泌量与相应各组 ALP 含量的变化趋势一致。与空白对照组比较, Wnt3a 组上调 COL1A1 mRNA、Runx2 mRNA; 与空白对照组比较, orexin-1 受体抑制剂组也上调 COL1A1 mRNA、Runx2 mRNA。实验结果提示 orexin-1 受体抑制剂能促进 BMSCs 的早期成骨分化指标碱性磷酸酶和成骨分化晚期指标 OCN 的表达, 启动 COL1A1 mRNA、Runx2 mRNA, 促进 BMSCs 成骨分化。

参考文献

[1] MENG X W. Epidemiology of osteoporosis in mainland China[J]. J Bone Miner Metab, 2005, 23(Suppl): 76-77.  
[2] 刘媛, 王永福, 刘忠厚, 等. 骨质疏松治疗的直接目标[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(3): 249-252.  
[3] 汪呈, 曹宇, 顾永清, 等. 骨质疏松治疗药物的研究进展[J]. 科学通报, 2014, 59(13): 1209-1214.  
[4] WEI W, MOTOIKE T, KRZESZINSKI J Y, et al. Orexin regulates bone remodeling via a dominant positive central action and a subordinate negative peripheral action[J]. Cell Metabolism, 2014, 6(19): 927-940.  
[5] 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1721-1725.  
[6] 祝旭龙, 颜谭, 姚维杰, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养方法优化[J]. 南方医科大学学报, 2014, 11(34): 1621-1626.  
[7] LIU R F, LI J Q, HOU R X, et al. Impact of BMSCs from different sources on proliferation of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells[J]. Genet



- Mol Res, 2015, 14(1):474-482.
- [8] 赵弼洲, 田佳灵, 余占海, 等. 淫羊藿苷对人牙周膜细胞 OCN 表达水平的影响[J]. 西部中医药, 2014, 27(1):26-28.
- [9] 于健. 成骨细胞分化过程中相关基因的表达[D]. 济南: 山东大学, 2013:14-18.
- [10] SAKURAI T, AMENMIYA A, ISHII M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior [J]. Cell, 1998, 92(4):573-585.
- [11] FUNATO H, TSAI A L, WILLIE J T, et al. Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet induced obesity and improves leptin sensitivity[J]. Cell Metab, 2009, 9(1):64-76.
- [12] HAYNES A C, CHAPMAN H, TAYLOR C, et al. Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice [J]. Regul Pept, 2002, 104(1/3):153-159.
- [13] ZIOLKOWSKA A, RUCINSKI M, TYCZEWSKA M, et al. Orexin B inhibits proliferation and stimulates specialized function of cultured rat calvarial osteoblast-like cell [J]. Int J Mol Med, 2008, 22(6):749-755.

## 药根碱对糖尿病模型大鼠 血管 Akt/AMPK/eNOS 信号通路的影响

王云山<sup>1</sup>, 张洪<sup>2</sup>, 张晓春<sup>1</sup>

(1. 湖北医药学院附属随州医院药剂科, 随州 441300; 2. 武汉大学人民医院药学部, 武汉 430060)

**摘要** 目的 观察药根碱对糖尿病大鼠血管蛋白激酶 B/一磷酸腺苷活化蛋白激酶/内皮型一氧化氮合酶(Akt/AMPK/eNOS)信号通路的影响及对糖尿病大鼠可能的保护作用机制。方法 将 60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、药根碱小剂量组和大剂量组,除正常对照组外,其他组通过诱导胰岛素抵抗后空腹腹腔注射链脲佐菌素制作 2 型糖尿病模型,正常对照组和模型对照组大鼠每日灌胃 5% 羧甲基纤维素钠溶液,药根碱大剂量组和小剂量组每日分别给予药根碱 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>,连续 8 周。检测各组大鼠体质量、血糖及血清胰岛素水平,酶联免疫吸附测定(ELISA)法比较各组大鼠血清中炎症因子白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平,Western blotting 法检测各组大鼠血管中 eNOS 蛋白及 Akt/AMPK 通路蛋白的表达。结果 与正常对照组比较,模型对照组大鼠体质量下降,血糖升高,血清胰岛素水平显著性升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型对照组比较,药根碱大剂量组体质量显著增加,血糖降低,胰岛素水平下降均差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。正常对照组血清中 IL-1β 为 (92.3±4.3) pg·mL<sup>-1</sup>,模型对照组为 (152.4±20.0) pg·mL<sup>-1</sup>,药根碱小剂量组和大剂量组分别为 (120.96±33.0), (95.05±7.7) pg·mL<sup>-1</sup>;模型对照组血清中 TNF-α 为 (10.50±0.82) pg·mL<sup>-1</sup>,正常对照组为 (7.48±0.36) pg·mL<sup>-1</sup>,药根碱小剂量组和大剂量组 TNF-α 分别为 (8.82±0.42) 和 (7.11±0.33) pg·mL<sup>-1</sup>;与正常对照组比较,模型对照组大鼠血管中 eNOS 表达量及磷酸化的 Akt 和 AMPK 含量显著减少,药根碱大剂量组较模型对照组显著提高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 药根碱可能通过影响糖尿病大鼠血管中 Akt/AMPK/eNOS 信号通路及对抗炎症作用对糖尿病大鼠具有保护作用。

**关键词** 药根碱;糖尿病;抗炎八月;一氧化氮合酶,内皮型

中图分类号 R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1107-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.005

### Effects of Jatrorrhizine on Akt/AMPK/eNOS Signaling Pathways in Blood Vessel of Diabetes Rats

WANG Yunshan<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>2</sup>, ZHANG Xiaochun<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, Suizhou Hospital, Hubei University of Medicine, Suizhou 441300, China; 2. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**ABSTRACT Objective** To observe the influence of jatrorrhizine on the Akt/AMPK/eNOS signaling pathways and potential protective function in blood vessel of diabetes rats. **Methods** Male Wistar rats ( $n = 60$ ) were randomly divided into normal control group, model control group, low-and high dose jatrorrhizine groups. Except normal control group, the other rats were given intraperitoneal injection of STZ after induced insulin resistance, to made type II diabetes model. CMC-Na solution (5%) was given to normal control and model control group, and the jatrorrhizine resolved in the same solution was administered to low (50 mg·kg<sup>-1</sup>) and high dose (100 mg·kg<sup>-1</sup>) jatrorrhizine groups for 8 weeks. Their body weight, blood glucose, and serum