

本文引用: 尹煜辉, 李 琰, 齐保玉, 刘 平, 朱立国, 刘 宁, 魏 戌. 基于有氧糖酵解探究补骨生髓方含药血清通过介导 HIF-1 α 促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化的作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(5): 818-824.

基于有氧糖酵解探究补骨生髓方含药血清通过介导 HIF-1 α 促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化的作用

尹煜辉¹, 李 琰¹, 齐保玉¹, 刘 平², 朱立国¹, 刘 宁¹, 魏 戌^{1*}

1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学, 北京 100105

[摘要] **目的** 探讨补骨生髓方(BGSSD)含药血清通过缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)介导 MC3T3-E1 细胞有氧糖酵解过程对成骨分化的影响。**方法** 选取 18 只 SD 大鼠随机分为含药血清组和空白血清组, 各 9 只。含药血清组按生药量 5.87 g/(kg·d) 给予 BGSSD 药液灌胃, 空白血清组给予 20 mL/(kg·d) 蒸馏水灌胃, 连续灌胃 9 次后收集腹主动脉血液, 获取 BGSSD 含药血清和空白血清。将 MC3T3-E1 细胞分为空白血清组、含药血清组和有氧糖酵解抑制剂组, 并将 HIF-1 α 慢病毒转染稳定的 MC3T3-E1 细胞作为 SiRNA HIF-1 α 组。空白血清组加入含 20% 空白血清的 α -MEM 培养基, 含药血清组和 SiRNA HIF-1 α 组均加入含 20% BGSSD 含药血清的 α -MEM 培养基, 有氧糖酵解抑制剂组加入含 20% BGSSD 含药血清和 8 mmol/L 抑制剂 2-脱氧葡萄糖的 α -MEM 培养基。采用碱性磷酸酶(ALP)染色法观察 4 组培养 7 d 后的黑色沉淀物情况; ELISA 检测培养 48 h 后细胞上清液中 ALP 和丙酮酸(PA)、乳酸(LA)的含量; qRT-PCR 和 Western blot 检测培养 48 h 后细胞 HIF-1 α 、Runt 相关转录因子 2(RUNX2)、丙酮酸脱氢酶激酶 1(PDK1) mRNA 相对表达水平和蛋白表达量。**结果** 与空白血清组比较, 含药血清组的黑色沉淀物明显增加、颜色加深, ALP、LA、PA 含量均升高($P < 0.05$), PDK1、RUNX2、HIF-1 α mRNA 相对表达水平和蛋白表达量均升高($P < 0.05$)。与含药血清组比较, SiRNA HIF-1 α 组和有氧糖酵解抑制剂组的黑色沉淀物减少、颜色变浅, ALP、LA 及 PA 含量均降低($P < 0.05$), PDK1、RUNX2 的 mRNA 相对表达水平和蛋白表达量均降低($P < 0.05$); SiRNA HIF-1 α 组 HIF-1 α 的 mRNA 相对表达水平和蛋白表达量降低($P < 0.05$)。**结论** BGSSD 可能通过 HIF-1 α 介导有氧糖酵解促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化, 其作用机制可能与调控 HIF-1 α /PDK1 通路相关。

[关键词] 骨质疏松症; 补骨生髓方; 有氧糖酵解; MC3T3-E1 细胞; 骨形成

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.05.006

Promotion of osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by serum containing Bugu Shengsui Decoction through mediating HIF-1 α based on aerobic glycolysis

YIN Yuhui¹, LI Yan¹, QI Baoyu¹, LIU Ping², ZHU Ligu¹, LIU Ning¹, WEI Xu^{1*}

1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100105, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of the Bugu Shengsui Decoction (BGSSF) containing serum on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by mediating aerobic glycolysis through hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). **Methods** A total

[收稿日期] 2024-12-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174416); 中国中医科学院基本科研业务费新入职青年科研人员培养专项课题(ZZ17-XXRZ-059); 中国中医科学院望京医院自主选题专项课题(WJYY-ZZXT-2023-16)。

[通信作者] * 魏 戌, 男, 博士, 研究员, E-mail: weixu.007@163.com。

of 18 SD rats were randomly divided into a drug-containing serum group and a blank serum group, with nine rats in each group. The drug-containing serum group was administered BGSSD solution by gavage at a raw drug dose of 5.87 g/(kg·d), while the blank serum group was given distilled water by gavage at a volume of 20 mL/(kg·d). After nine consecutive gavages, blood was collected from the abdominal aorta to obtain serum containing BGSSD and blank serum. MC3T3-E1 cells were divided into a blank serum group, a drug-containing serum group, and an aerobic glycolysis inhibitor group. Additionally, MC3T3-E1 cells stably transfected with HIF-1 α lentivirus were designated as the SiRNA HIF-1 α group. The blank serum group was cultured in α -MEM medium containing 20% blank serum, while both the drug-containing serum group and the SiRNA HIF-1 α group were cultured in α -MEM medium containing 20% serum containing BGSSD. The aerobic glycolysis inhibitor group was cultured in α -MEM medium containing 20% BGSSF containing serum and 8 mmol/L of the inhibitor 2-deoxyglucose. Alkaline phosphatase (ALP) staining was used to observe the black precipitates in the four groups after seven days of culture. ELISA was employed to determine the content of ALP, pyruvic acid (PA), and lactic acid (LA) in the cell supernatant after 48 hours of culture. qRT-PCR and Western blot were utilized to measure the relative mRNA expression levels and protein expression amounts of HIF-1 α , Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), and pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) in the cells after 48 hours of culture. **Results** Compared with the blank serum group, the drug-containing serum group exhibited a notable increase in black precipitates with deeper coloration, along with elevated levels of ALP, LA, and PA ($P<0.05$). Additionally, the relative mRNA expression levels and protein expression amounts of PDK1, RUNX2, and HIF-1 α all increased in the drug-containing serum group ($P<0.05$). Compared with the drug-containing serum group, the SiRNA HIF-1 α group and the aerobic glycolysis inhibitor group showed reduced black precipitates with lighter coloration, as well as decreased levels of ALP, LA, and PA ($P<0.05$). The relative mRNA expression levels and protein expression amounts of PDK1 and RUNX2 also decreased in these two groups ($P<0.05$). The relative mRNA expression levels and protein expression amounts of HIF-1 α reduced in the SiRNA HIF-1 α group ($P<0.05$). **Conclusion** BGSSD may promote osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by mediating aerobic glycolysis through HIF-1 α , and its mechanism of action might be related to the regulation of the HIF-1 α /PDK1 pathway.

[**Keywords**] osteoporosis; Bugu Shengsui Decoction; aerobic glycolysis; MC3T3-E1 cells; bone formation

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种代谢性骨科疾病,其微观表现为单位体积骨量下降、骨强度降低和骨脆性增加,在肌肉含量和力量下降以及跌倒等因素的共同影响下容易发生骨折,对患者生活和经济造成极大的负担^[1-2]。OP的病理机制主要是成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收失衡,致使机体骨量丢失^[3]。当前,临床药物主要通过抑制破骨细胞功能实现OP治疗,如双磷酸盐类药物凭借与骨组织的高亲和力,在骨重建活跃处接触结合,抑制破骨作用和骨吸收,但长期使用可增加下颌骨坏死的风险^[4]。临床上可促进骨形成的生物制剂为特立帕肽,其可缓解患者的症状,延缓机体骨量丢失的进程,但存在治疗周期长、患者依从性差和治疗费用高等不足,一定程度上限制了其在临床的应用^[5]。为获得更好的OP临床疗效,提高患者的依从性,寻找合适且便捷的治疗方法和手段是目前治疗OP的重要科学问题。

中药复方因具有多靶点和多组分的特征,在OP治疗中有明显优势^[6]。中医学认为OP属于“骨痿”范畴,其病机为肾虚髓减、髓亏失养^[7]。补骨生髓方(Bugu Shengsui Decoction, BGSSD)具有补益肝肾、

健脾益气活血的功效,临床试验表明,其可提高骨密度、抑制骨吸收、防治骨量丢失、改善OP的症状^[8]。研究发现,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是有氧糖酵解的关键调节因子,可通过诱导靶向关键酶丙酮酸脱氢酶激酶1(pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)来调控有氧糖酵解途径^[9]。而有氧糖酵解是MC3T3-E1细胞适应内环境变化的一种能量代谢方式,为骨形成提供重要的生物动力^[10]。可见有氧糖酵解和HIF-1 α 与骨形成存在紧密联系,是OP发生的一个重要因素。前期研究发现,BGSSD对MC3T3-E1细胞成骨分化有较好的促进作用,并且可上调小鼠骨组织中HIF-1 α 的蛋白表达,而BGSSD是否通过HIF-1 α 影响成骨细胞的有氧糖酵解进行成骨分化调控有待探究^[11]。因此,本研究拟从HIF-1 α 介导有氧糖酵解的角度,探索BGSSD含药血清调控MC3T3-E1细胞成骨分化的分子机制。

1 材料

1.1 细胞及动物

小鼠胚胎成骨细胞MC3T3-E1细胞系,货号:

06.1187,购自北京中生奥邦生物科技有限公司。18只2月龄SD大鼠,SPF级,体质量(300±30)g,购自北京大学医学部(实验动物科学部),质量合格证编号为SCXK(京)2022-0009。所有大鼠均饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心(SPF级),饲养温度为22~25℃,湿度为55%~65%,日照时间为8:00至19:00,按照实验动物中心要求,每周更换2次垫料,保持环境干燥。本实验已通过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心伦理委员会审查批准,动物伦理批号为IBTCM CACMS21-2403-08。

1.2 实验药物

BGSSD由骨碎补、补骨脂、三七、人参、生牡蛎、狗脊、枸杞子、砂仁8味药组成,由中国中医科学院望京医院中药房提供。将药物加入纯净水中,完全在水面下浸泡1h。通过中药熬药浓缩煎药机进行煎煮,大火烧开后转小火煎煮40min,然后将药液全部转移至清洁容器;再加入适量纯净水进行煎煮,同样操作40min后倒渣取汁。将2次煎煮药汁混合,纱布过滤,并浓缩至浓度为0.406g/mL,该浓度在前期体内动物实验中干预效果最佳^[1],故选此作为后续含药血清制备干预浓度。最后倒入三七粉并搅拌均匀,在4℃冰箱中保存^[1]。

1.3 主要试剂

α-MEM培养基(上海源培生物科技股份有限公司,批号:L571KJ);胎牛血清(批号:A5669701)、青链双抗(批号:15070063)、胰蛋白酶(批号:15050065)均购自美国Gibco公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(批号:A0208)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(批号:A0216)、细胞裂解液(批号:P0013)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010)均购自上海碧云天生物技术有限公司;PDK1(批号:18262-1-AP)、Runt相关转录因子2(Runt associated transcription factor 2, RUNX2)(批号:20700-1-AP)、GAPDH(批号:60004-1-1g)抗体均购自美国Proteintech公司;HIF-1α抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号:14179s);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)ELISA试剂盒(武汉华联科生物技术有限公司,批号:HL-ALP-48T);乳酸(lactic acid, LA)含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:BC2235);丙酮酸(pyruvic acid, PA)含量检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:BC2205);SYBR荧光定量聚合酶链反应预混液(批号:Q331-03)、HiScript II逆转录酶

第一链合成试剂盒(批号:R223)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;总RNA提取试剂盒(中国新赛美生物科技股份有限公司,批号:M5102);成骨鉴定试剂盒(ALP钙钴染色法)(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:KGA353)。

1.4 主要仪器

CO₂恒温细胞培养箱(日本Panasonic公司,型号:MCO-18AC);恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司,型号:DK-500);超纯水机(美国Millipore公司,型号:MILLI-QB);水平摇床(美国Scilogex公司,型号:SLK-O3000-S);pH计(德国Metter-Toledo公司,型号:LP115);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,型号:CPA);磁力搅拌器(江苏省金坛市中大仪器厂,型号:T8-1);酶标仪(美国Thermo公司,型号:muLISKANMK3);全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司,型号:5260Muti);实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司,型号:ABI 7500)。

2 方法

2.1 血清制备

18只SD大鼠随机分为含药血清组和空白血清组,各9只。适应性喂养1周后,按照60kg成人与300g大鼠体表面积换算公式进行换算^[12]。含药血清组按生药量5.87g/(kg·d)给予BGSSD药液灌胃,空白血清组给予20mL/(kg·d)蒸馏水灌胃,每日给药2次,连续灌胃5d,最后1d仅灌胃1次,共灌胃9次。最后1次灌胃给药1h后,使用5%异氟醚吸入麻醉,收集大鼠的腹主动脉血液后通过脊柱脱臼法处死大鼠,4℃下放置1h。4℃下3000r/min离心10min(离心半径为8cm)。将收集到的空白血清和BGSSD含药血清置于56℃水浴加热30min灭活处理,0.22μm微孔滤膜过滤,储存于-80℃冰箱备用。

2.2 细胞培养

将原代MC3T3-E1细胞复苏并传代,使用含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的α-MEM完全培养基,在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中进行培养,将细胞培养至第3~5代用于实验。在实验进行前均将MC3T3-E1细胞进行去血清培养,饥饿处理24h以保证细胞同步化。

2.3 分组及干预

参照前期研究结果,BGSSD含药血清干预MC3T3-E1细胞的最佳给药浓度为20%、最佳给药时间为48h^[1]。将MC3T3-E1细胞分为空白血清组、

含药血清组和有氧糖酵解抑制剂组,并将 HIF-1 α 慢病毒转染稳定的 MC3T3-E1 细胞作为 SiRNA HIF-1 α 组^[11]。接种铺板后待细胞生长至 70% 融合面积,使用无血清培养基饥饿处理 24 h 后,空白血清组加入含 20% 空白血清的 α -MEM 培养基;含药血清组和 SiRNA HIF-1 α 组均加入含 20% BGSSD 含药血清的 α -MEM 培养基;有氧糖酵解抑制剂组加入含 20% BGSSD 含药血清和 8 mmol/L 2-脱氧葡萄糖的 α -MEM 培养基。

2.4 ALP 染色观察细胞矿化情况

将细胞接种于 6 孔板中,培养 7 d,待生长培养至 80%~90%,用 PBS 溶液清洗 2 遍,70% 乙醇固定。加入孵育工作液于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 180 min,水洗 5~10 min。染色 A 液室温孵育 5 min 后水洗 2 min,染色 B 液室温孵育 1 min 后水洗 5 min,应用显微镜观察细胞矿化情况并拍照。

2.5 ELISA 检测 ALP、LA、PA 含量

选取第 3 代生长情况适宜的 MC3T3-E1 细胞,接种于 96 孔细胞培养板中,每组设 3 个复孔,在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 48 h 后收集各组细胞上清液,并按照 ELISA 试剂盒说明书操作检测 ALP、LA、PA 含量。

2.6 qRT-PCR 检测 PDK1、RUNX2、HIF-1 α mRNA 相对表达水平

将 MC3T3-E1 细胞接种于 6 孔细胞培养板,每组设 3 个复孔,干预结束后经胰蛋白酶消化,离心收集细胞沉淀,Trizol 法收集样本 RNA,逆转录得到样本的 cDNA。引物序列由上海捷瑞生物有限公司设计与合成,见表 1。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C、30 s、95 $^{\circ}$ C、10 s、60 $^{\circ}$ C、30 s、40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算与分析 mRNA 相对表达量。

表 1 相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences of related genes

基因名称	引物序列	产物长度/bp
PDK1	正向:5'-CAGAAACCGGCACAATGAT-3'	200
	反向:5'-TTCGATGAGATGGACTTCCTT-3'	
RUNX2	正向:5'-GTCCCAACTTCCTGTGCTC-3'	199
	反向:5'-TCGTTGAACCTGGCTACTTG-3'	
HIF-1 α	正向:5'-TGAACATCAAGTCAGCAACG-3'	200
	反向:5'-GAGGCTGTGTCGACTGAGAA-3'	
GAPDH	正向:5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'	218
	反向:5'-CTCGCTCCTGGAAGATGCTG-3'	

2.7 Western blot 检测 PDK1、RUNX2、HIF-1 α 蛋白表达量

使用 6 孔细胞培养板接种细胞,每组设 3 个复孔,干预结束后胰蛋白酶消化并离心收集细胞沉淀,细胞裂解液裂解细胞,BCA 法检测蛋白浓度。煮沸 5 min 使蛋白变性,经 SDS-PAGE 电泳、转膜后,使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,置于 PDK1(1:1 000)、RUNX2(1:200)、HIF-1 α (1:1 000)一抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,清洗 3~4 次后置于相应二抗(1:1 000)中孵育 2 h。应用全自动化学发光分析仪系统成像,采用 ImageJ 软件进行灰度值分析,统计各组蛋白相对表达量。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析。计量资料符合正态分布者以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析。若方差齐,两两比较采用 LSD-*t* 检验;若方差不齐,则采用 Games-Howell 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组细胞矿化情况比较

与空白血清组比较,含药血清组黑色沉淀物明显增加、颜色加深;与含药血清组比较,SiRNA HIF-1 α 组和有氧糖酵解抑制剂组黑色沉淀物减少、颜色变浅。详见图 1。

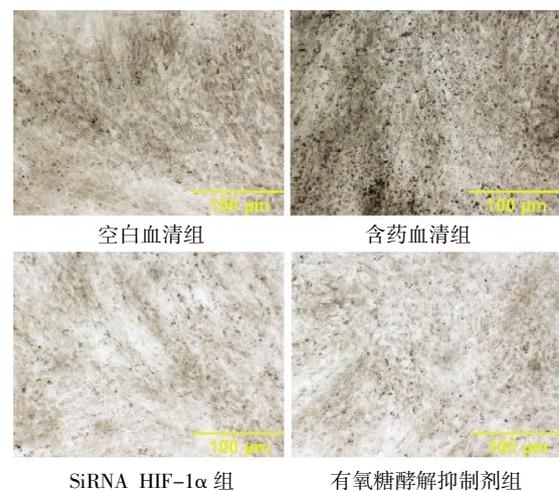


图 1 各组细胞 ALP 染色图($\times 100$)

Fig.1 ALP staining images of cells in each group ($\times 100$)

3.2 各组细胞 ALP、LA、PA 含量比较

与空白血清组比较,含药血清组 ALP、LA、PA 含

量均升高($P<0.05$);与含药血清组比较,SiRNA HIF-1 α 组和有氧糖酵解抑制剂组 ALP、LA 及 PA 含量均降低($P<0.05$)。详见图 2。

3.3 各组细胞 PDK1、RUNX2、HIF-1 α mRNA 相对表达水平比较

与空白血清组比较,含药血清组 PDK1、RUNX2、HIF-1 α mRNA 相对表达水平均升高($P<0.05$);与含药血清组比较,SiRNA HIF-1 α 组和有氧糖酵解抑制剂组 PDK1、RUNX2 的 mRNA 相对表达水平均降低($P<0.05$),SiRNA HIF-1 α 组 HIF-1 α 的 mRNA 相对表达水平均降低($P<0.05$)。详见图 3。

3.4 各组细胞 PDK1、RUNX2、HIF-1 α 蛋白表达量比较

与空白血清组比较,含药血清组 PDK1、RUNX2、HIF-1 α 蛋白表达量均升高($P<0.05$)。与含药血清组比较,SiRNA HIF-1 α 组和有氧糖酵解抑制剂组

PDK1、RUNX2 蛋白表达量均降低($P<0.05$);SiRNA HIF-1 α 组 HIF-1 α 蛋白表达量降低($P<0.05$)。详见图 4—5。

4 讨论

BGSSD 是由周文泉主任和谢雁鸣主任、王永炎院士依据临床 OP 发病特点联合创制而成。前期临床研究表明,BGSSD 可改善原发性 OP 患者肾虚虚症状、提高骨密度值^[8]。目前,成骨细胞分化研究多聚焦于自分泌、旁分泌及内分泌信号通路介导的分子对成骨细胞特异基因表达与成骨分化的调控,而忽视了其获得特定生物学功能时的能量代谢调控。研究表明,成熟的成骨细胞虽富含线粒体,但即便在 O₂ 充足时,仍优先通过糖酵解将葡萄糖转化为 LA 进行细胞供能,而非通过线粒体的三羧酸循环供能,这种现象与瓦氏效应相类似,即有氧糖酵解^[13]。因此,

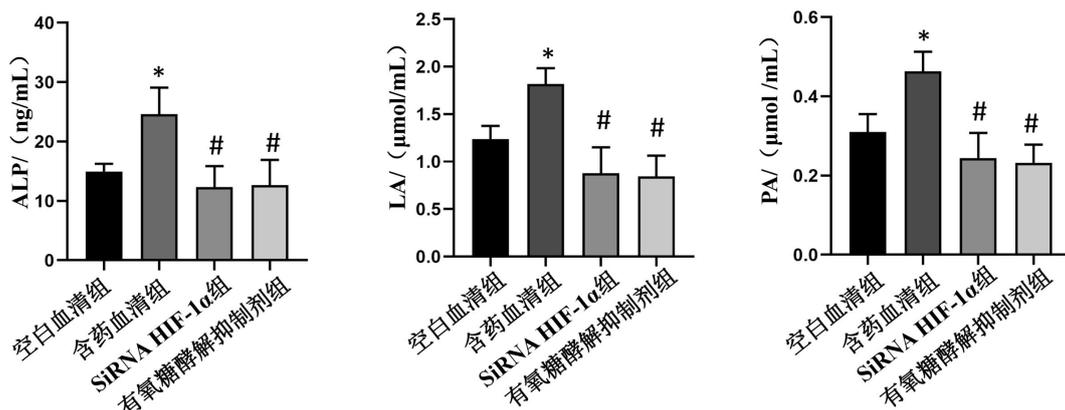


图2 各组细胞 ALP、LA、PA 含量比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.2 Comparison of ALP, LA and PA content among different groups of cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$;与含药血清组比较,# $P<0.05$ 。

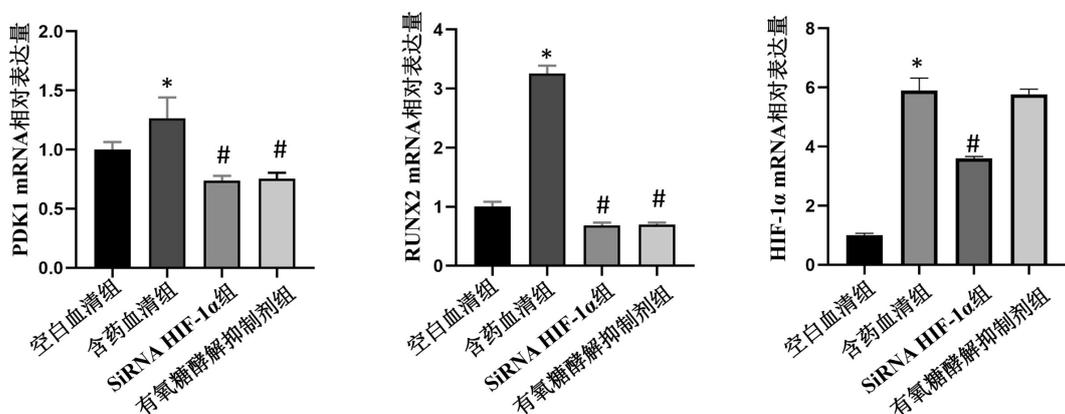


图3 各组细胞 PDK1、RUNX2、HIF-1 α mRNA 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.3 Comparison of the relative mRNA expression levels of PDK1, RUNX2, and HIF-1 α among different groups of cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$;与含药血清组比较,# $P<0.05$ 。

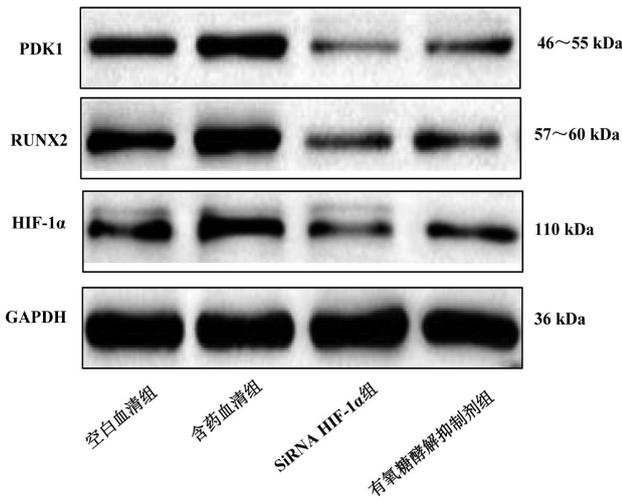


图 4 各组细胞 PDK1、RUNX2、HIF-1α 蛋白条带图
 Fig.4 Protein band patterns of PDK1, RUNX2, and HIF-1α in different groups of cells

进一步探索有氧糖酵解和骨形成的联系,从有氧糖酵解角度寻找 BGSSD 治疗 OP 的潜在靶点,对提高其临床疗效具有重要意义。

MC3T3-E1 细胞是成骨前体细胞,该细胞与成骨细胞具有相似的增殖、分化细胞特性,因此较多研究以此作为 OP 的基础研究模型^[14]。细胞能量代谢失衡会对机体骨稳态的平衡造成破坏,进而引起或加剧 OP 和骨质疏松性骨折等疾病^[15]。临床上常见糖尿病患者并发骨质疏松或骨折,所以机体糖代谢水平与骨稳态存在重要关联且相互影响^[16]。PDK1 作为 MC3T3-E1 细胞有氧糖酵解过程的关键限速酶,对促进 MC3T3-E1 细胞的糖酵解代谢过程具有重要影响;PA 和 LA 作为有氧糖酵解的重要产物,可揭示细胞有氧糖酵解的反应程度;在 PDK1 作用驱动下产生的 ATP 可

使 RUNX2、ALP 等成骨分化因子增加^[17-19]。本研究结果显示,与空白血清组比较,含药血清组能有效增强 MC3T3-E1 细胞矿化能力,促进成骨细胞分化标志物 ALP 分泌增加、骨形成标志物 RUNX2 表达上调;有氧糖酵解反应酶 PDK1 表达上调,PA、LA 含量增加,表明 BGSSD 含药血清可有效促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化,并且加强有氧糖酵解过程,为 MC3T3-E1 细胞成骨分化提供充足的糖酵解反应底物和 ATP。

HIF-1α 在成骨细胞有氧糖酵解调控中起关键作用,作为驱动因子与相关基因启动子结合,激活糖代谢重编程,促使 LA 积累,引发有氧糖酵解^[9]。此外,有氧糖酵解的流量加速可激活 HIF-1α 通路,减少 PA 进入线粒体氧化^[9]。HIF-1α 还可诱导 PDK1 下调线粒体的功能,进一步促进有氧糖酵解^[20]。小鼠体内过表达 HIF-1α 可促进骨形成,敲除有氧糖酵解关键酶 PDK1 后,可逆转 HIF-1α 导致的骨量增加^[21]。此外,骨形态发生蛋白 9 可诱导 HIF-1α 上调 PDK1,加速有氧糖酵解,而 HIF-1α 抑制剂可明显抑制 PDK1 的表达^[22]。这表明 HIF-1α 在成骨细胞内可通过有氧糖酵解对骨量的增加起促进作用。本研究结果显示,含药血清组可促进 HIF-1α 基因和蛋白的表达,加强 MC3T3-E1 细胞成骨分化以及有氧糖酵解反应;siRNA HIF-1α 组未能激活 HIF-1α 信号通路, HIF-1α 水平下降,成骨分化因子 ALP 水平和 RUNX2 表达下降,有氧糖酵解关键酶 PDK1 表达以及相应的底物 PA、LA 的含量均下降;有氧糖酵解抑制剂组则抑制 HIF-1α 下游靶蛋白调控的成骨分化功能以及有氧糖酵解反应水平,不影响 HIF-1α 的相关表达。

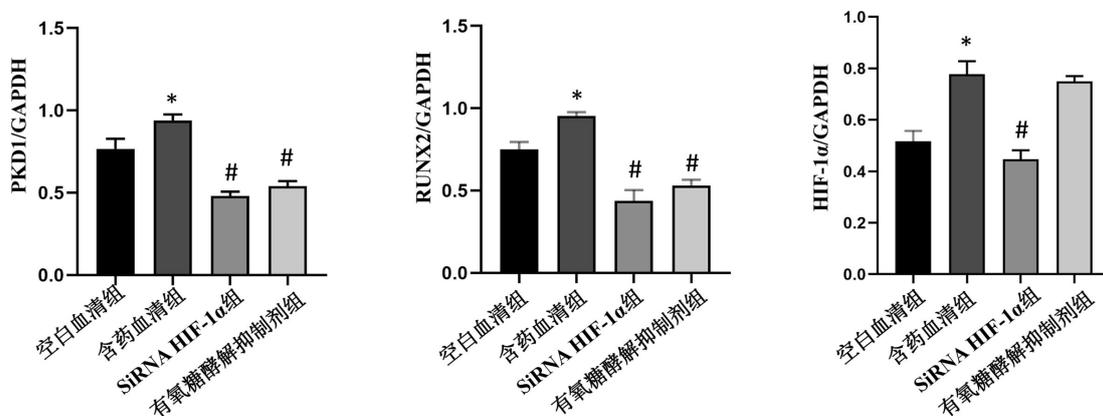


图 5 各组细胞 PDK1、RUNX2、HIF-1α 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Comparison of the protein expression levels of PDK1, RUNX2, and HIF-1α among different groups of cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白血清组比较,* $P < 0.05$;与含药血清组比较,# $P < 0.05$ 。

这说明有氧糖酵解在 BGSSD 促进成骨细胞分化过程中具有重要作用,而 HIF-1 α 在此过程中扮演关键角色,一定程度上阐释了 BGSSD 在促成骨分化过程中的调控机制。因此,HIF-1 α 可能是中药复方 BGSSD 含药血清介导成骨细胞分化的潜在分子,可通过有氧糖酵解消耗更多的葡萄糖,维持细胞正常生理活动。

综上所述,BGSSD 含药血清能有效促进骨形成,其机制可能与 HIF-1 α 介导的有氧糖酵解有关。后续课题组将对 HIF-1 α 介导的有氧糖酵解通路相关分子以及 BGSSD 促进有氧糖酵解的具体机制展开深入研究,以期为临床治疗 OP 提供思路。

参考文献

- [1] PATEL D, WAIRKAR S. Bone regeneration in osteoporosis: Opportunities and challenges[J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2023, 13(2): 419-432.
- [2] WANG Y H, HAN X, SHI J R, et al. Distinct metabolites in osteopenia and osteoporosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Nutrients*, 2023, 15(23): 4895.
- [3] KIM B J, KOH J M. Coupling factors involved in preserving bone balance[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(7): 1243-1253.
- [4] 王青青. 原发性骨质疏松症药物治疗进展[J]. *浙江医学*, 2024, 46(7): 673-681.
- [5] 中国药学会医院药专业委员会,《骨质疏松症治疗药物合理应用专家共识 2023》编写组. 骨质疏松症治疗药物合理应用专家共识(2023)[J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(9): 985-1006.
- [6] 齐艳喆, 王 姿, 欧阳厚淦, 等. 中药调控 p38 MAPK、ERK1/2、JNK 等治疗骨质疏松症的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(12): 222-229.
- [7] 世界中医药学会联合会骨质疏松专业委员会, 上海中医药大学附属龙华医院, 中日友好医院, 等. 骨质疏松症中西医结合诊疗专家共识[J]. *世界中医药*, 2023, 18(7): 887-894.
- [8] 谢雁鸣, 张方直, 周文泉, 等. 补肾生髓胶囊治疗肾阳虚证原发性骨质疏松症的临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(9): 526-530.
- [9] TAO J M, MIAO R, LIU G, et al. Spatiotemporal correlation between HIF-1 α and bone regeneration[J]. *FASEB Journal*, 2022, 36(10): e22520.
- [10] VADIVALAGAN C, KRISHNAN A, CHEN S J, et al. The Warburg effect in osteoporosis: Cellular signaling and epigenetic regulation of energy metabolic events to targeting the osteocalcin for phenotypic alteration[J]. *Cellular Signalling*, 2022, 100: 110488.
- [11] 刘 宁. 补肾生髓方调控 EphrinB2/EphB4/ERK 通路抗骨质疏松的机制研究及其化学成分分析[D]. 北京: 中国中医科学院, 2023.
- [12] 赵 伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(5): 52-53.
- [13] 张秀娟. OVOL2 在糖酵解中的功能及其机制研究[D]. 北京: 军事科学院, 2023.
- [14] HAAG S L, SCHIELE N R, BERNARDS M T. Enhancement and mechanisms of MC3T3-E1 osteoblast-like cell adhesion to albumin through calcium exposure[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(2): 492-502.
- [15] DONAT A, KNAPSTEIN P R, JIANG S, et al. Glucose metabolism in osteoblasts in healthy and pathophysiological conditions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 4120.
- [16] 谭文彬, 李 佳, 刘明玉, 等. 糖尿病及降糖药物对骨代谢及骨折影响的相关研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2024, 45(1): 44-48.
- [17] GANAPATHY-KANNIAPPAN S. Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: Current insights into the classic metabolic phenotype[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 53(6): 667-682.
- [18] JIANG B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment [J]. *Genes & Diseases*, 2017, 4(1): 25-27.
- [19] 石 玉. 能量代谢在成骨和破骨细胞中的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2021, 39(5): 501-509.
- [20] DENKO N C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(9): 705-713.
- [21] REGAN J N, LIM J, SHI Y, et al. Up-regulation of glycolytic metabolism is required for HIF1 α -driven bone formation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(23): 8673-8678.
- [22] AMIR M S, CHIBA N, SEONG C H, et al. HIF-1 α plays an essential role in BMP9-mediated osteoblast differentiation through the induction of a glycolytic enzyme, PDK1[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2022, 237(4): 2183-2197.

(本文编辑 周 旦)