

当归多糖减轻5-氟尿嘧啶对骨髓基质 细胞成骨分化的抑制

齐嵘嘉 肖含先之 汪子铃 邓方芳 吴奇 王亚平 王璐*
(重庆医科大学干细胞与组织工程研究室, 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016)

摘要 该实验探讨当归多糖(ASP)对改善5-氟尿嘧啶(5-FU)所致人骨髓基质细胞成骨与成脂分化失衡的作用。人骨髓基质细胞株HS-5体外培养分为: 对照组、ASP组、5-FU组、5-FU+ASP组和5-FU+LiCl组。CCK-8检测细胞抑制率, 流式细胞术检测细胞凋亡; 成骨与成脂诱导分化实验检测细胞成骨与成脂分化能力, Western blot检测Runx2、PPAR γ 和 β -catenin蛋白表达, RT-PCR检测Runx2、OCN、BMP-2、Osterix、PPAR γ 和 β -catenin mRNA表达。结果表明, 与对照组相比5-FU作用HS-5细胞后细胞增殖抑制、凋亡率增加, 成骨分化能力减弱、成脂分化能力增强, 分化相关信号 β -catenin蛋白和mRNA表达降低; 相比5-FU组, ASP预处理可减少细胞凋亡; 恢复细胞成骨分化能力, 成骨相关因子Runx2、OCN、BMP-2和Osterix表达升高; 降低细胞成脂分化能力, 成脂相关因子PPAR γ 表达减少; β -catenin信号分子表达增加。结果提示, 当归多糖可维持5-FU作用后骨髓基质细胞朝成骨方向分化的能力, 其机制可能与激活Wnt/ β -catenin信号通路有关。

关键词 5-氟尿嘧啶; 骨髓基质细胞; 成骨分化; Wnt/ β -catenin信号通路; 当归多糖

Angelica sinensis Polysaccharides Reduce 5-Fluorouracil-Induced Inhibition on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells

QI Rongjia, XIAO Hanxianzhi, WANG Ziling, DENG Fangfang, WU Qi, WANG Yaping, WANG Lu*
(Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of the study was to investigate the effect of ASP (*Angelica sinensis* polysaccharides) on ameliorating the imbalance of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells induced by 5-FU (5-fluorouracil). Human bone marrow stromal cell line HS-5 cells were cultured *in vitro* and divided into: Control group, ASP group, 5-FU group, 5-FU+ASP group and 5-FU+LiCl group. Cell inhibition rate of HS-5 cells was detected by CCK-8 assay, and the cellular apoptosis was analyzed by flow cytometry. The ability of BMSCs for osteogenesis and adipogenic differentiation was detected by osteogenic and adipogenic differentiation assays. The expressions of Runx2, PPAR γ and β -catenin proteins were measured by Western blot. The mRNA expressions of Runx2, OCN, BMP-2, Osterix, PPAR γ and β -catenin were detected by RT-PCR. The results indicated that compared with the control group, the proliferative capacity of HS-5 cells was inhibited and the apopto-

收稿日期: 2019-10-31 接受日期: 2020-01-17

国家自然科学基金(批准号: 81173398)和重庆市科学技术委员会基础与前沿研究项目(批准号: cstc2014jcyjA10001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485626, E-mail: luwang@cqmu.edu.cn

Received: October 31, 2019 Accepted: January 17, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81173398), the Foundation and Frontier Research Project of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.cstc2014jcyjA10001)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485626, E-mail: luwang@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5198>

sis rate was increased in the 5-FU group. The osteogenesis potential was decreased whereas adipogenesis potential was enhanced. The mRNA and protein levels of differentiation-related signaling molecule β -catenin were decreased. However, compared with the 5-FU group, the apoptosis rate of HS-5 cells was decreased after ASP pretreatment. The osteogenesis ability of HS-5 was restored while the adipogenesis potential was reduced. The expression of osteogenic-related factors including Runx2, OCN, BMP-2 and Osterix was increased whereas the expression of the lipid-related factor PPAR γ was decreased. The expression of β -catenin was increased in 5-FU+ASP group. The results suggested that *Angelica sinensis* polysaccharides protected bone marrow stromal cells against 5-FU via maintaining osteogenesis potential, and the underlying mechanism might be related to activating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords 5-fluorouracil; bone marrow stromal cells; osteogenic differentiation; Wnt/ β -catenin signaling pathway; *Angelica sinensis* polysaccharides

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)治疗恶性肿瘤的同时会产生骨髓抑制^[1]。急性骨髓抑制可在化疗结束后短时间内经造血生长因子调控而恢复,但慢性骨髓抑制常与骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)损伤密切相关,慢性骨髓抑制会导致造血功能长时受损^[2]。骨内膜龛是造血微环境的核心组成,主要由骨系细胞(osteolineage cells)包括骨祖细胞(osteoprogenitor cells)、成骨细胞前体(pre-osteoblasts)、成骨细胞(osteoblasts)、间充质干细胞和CAR细胞(CXCL12-abundant reticular cells)等基质细胞组成^[3-4],通过产生细胞因子、细胞外基质和黏附分子维持造血干细胞干性、调控干细胞分化。文献报道,间充质干细胞既可朝骨系细胞方向分化也可分化为骨髓中脂肪细胞,骨系细胞促进造血,脂肪细胞抑制造血,故维持间充质干细胞的成骨分化方向是稳定骨内膜龛的必要条件^[5-7]。氧化应激等条件可打破间充质干细胞成骨分化与成脂分化平衡,造成骨内膜龛损伤,分化朝成脂方向偏移,进而影响骨髓造血功能^[8]。Wnt/ β -catenin信号通路是调控骨髓间充质干细胞成骨与成脂分化方向的经典信号通路, β -catenin入核激活下游成骨相关转录因子、抑制成脂相关转录因子,促进间充质干细胞朝成骨方向分化^[9-12]。

当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharides, ASP)为中药当归的有效药用成分,具有抗氧化、促造血等功效。课题组前期工作证实,ASP可减轻5-FU对BMSCs的氧化损伤从而延缓造血细胞氧化应激性早衰^[13-14],而ASP是否可以通过保护BMSCs朝成骨方向分化的能力从而拮抗5-FU、改善造血微环境,目前尚不清楚。HS-5为正常人源骨髓基质细胞株,有类似间充质干细胞的表型^[15-17],本实验以人骨髓基质细胞株HS-5为研究对象,探讨ASP对5-FU作用

后的骨髓基质细胞成骨与成脂分化能力的影响。本研究旨在为缓解化疗诱导的造血微环境损伤提供新的实验依据和治疗思路。

1 材料和方法

1.1 材料

人骨髓基质细胞株HS-5购自美国Type Culture Collection公司。

1.2 试剂及仪器

ASP购自陕西慈缘生物技术有限公司(批号为CY130421,甘肃岷县当归提取,纯度为98%);DMEM-高糖培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自澳大利亚MRC公司;5-氟尿嘧啶购自美国Sigma公司;LiCl购自中国天津市大茂化学试剂厂(纯度>95%);成骨与成脂诱导分化培养基购自苏州赛业生物科技有限公司;PBS溶液、细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒以及Runx2单克隆抗体购自中国碧云天生物技术有限公司; β -catenin、 β -actin单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;PPAR γ 单克隆抗体购自Santa生物技术有限公司。

CO₂细胞培养箱购自美国Sanyo公司;倒置显微镜购自美国Olympus公司;多功能酶标仪购自瑞士Tecan公司;印迹电泳转移系统和凝胶成像仪购自美国BioRad公司。

1.3 细胞培养及分组

含10%胎牛血清的DMEM-高糖培养基重悬HS-5细胞,将细胞密度调整为 1×10^4 个/cm²,种植于25 cm²的细胞培养瓶中。实验分为5组,对照组(常规培养)、ASP组(常规培养加入100 μ g/mL的ASP)、5-FU组(常规培养加入25 μ g/mL 5-FU)、5-FU+ASP组(ASP预培养细胞6 h,再加入25 μ g/mL 5-FU)和

5-FU+LiCl组(常规培养加入10 mmol/L的LiCl培养细胞6 h, 再加入25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FU)。各组于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱内培养48 h。

1.4 CCK-8检测细胞抑制率

HS-5细胞以 5×10^3 个/孔种植于96孔板中, 贴壁后加入12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度5-FU分别作用细胞24、48、72 h, 再加入CCK-8工作液37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h后, 酶标仪450 nm波长下检测吸光度(D)值。抑制率= $[(\text{对照组}D - \text{实验组}D) / (\text{对照组}D - \text{空白组}D)] \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

取10 mL含10%胎牛血清的DMEM-高糖培养基重悬HS-5细胞为密度 2.5×10^5 个/mL, 种植于直径为100 mm的细胞培养皿中, 细胞加药分组于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱内培养48 h, 每组设置3个平行样本, 实验重复3次($n=3$)。PBS清洗培养基后胰酶消化收集各组细胞于1.5 mL EP管中, 1 000 r/min离心5 min后弃上清, 每管加入0.5 mL PBS溶液混匀细胞, 送流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.6 细胞成骨诱导分化培养与茜素红染色

HS-5细胞以 2×10^4 个/ cm^2 细胞密度接种于6孔板, 贴壁生长至70%以上, 分组加药处理48 h后更换成骨诱导培养基(抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、谷氨酰胺), 每隔2天避光换液, 培养14天后4%多聚甲醛固定, 茜素红染色, 相差显微镜下拍照。拍照后, 每孔加入100 μL 异丙醇溶解茜素红染液, 酶标

仪490 nm处检测吸光度(D)值, 进行定量分析。

1.7 细胞成脂诱导分化培养与油红O染色

按照上述方法加药处理各组细胞48 h后, 更换成脂诱导培养基A液(谷氨酰胺、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、罗格列酮、地塞米松), 3天后更换B液(谷氨酰胺、胰岛素)作用24 h, A、B液交替处理20天后, B液连续培养细胞5天。细胞经4%多聚甲醛固定, 油红O染色拍照。拍照后每孔加入100 μL 异丙醇溶解染液, 于波长490 nm处测量 D 值, 进行定量分析。

1.8 Western blot

收集各组细胞, 裂解后收集上清液。BCA法测蛋白浓度, 蛋白分装后SDS-PAGE电泳, PVDF膜转膜, 脱脂奶粉摇床室温封闭2 h, β -catenin、Runx2、PPAR γ 及 β -actin抗体(均为1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日羊抗兔或兔抗小鼠HRP标记二抗(1:10 000)室温孵育2 h。ECL化学发光凝胶成像, Image Lab 5.2.1软件半定量分析。

1.9 RT-PCR

收集各组细胞, 按照Trizol试剂盒说明书提取总RNA, 逆转录至cDNA。SYBR II染料法进行荧光定量PCR反应, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸退火30 s, 循环40次。运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法确定 β -catenin、Runx2、Osterix、OCN、BMP-2及PPAR γ mRNA相对表达水平, 以GAPDH为内参, 引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成(表1)。

表1 荧光定量PCR引物序列

Table1 Primer sequences of RT-PCR

基因 Gene	方向 Direction	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
β -catenin	Forward	GAG GAG ATG TAC ATT CAG CAG A
	Reverse	GTT GAC CAC CCC TGC ATA G
Runx2	Forward	AAC AGC AGC AGC AGC AGC AG
	Reverse	GCA CCG AGC ACA GGA AGT TGG
Osterix	Forward	GCG GCA AGG TGT ATG GCA AGG
	Reverse	GCA GAG CAG GCA GGT GAA CTT C
OCN	Forward	CTA CCT GTA TCA ATG GCT GGG
	Reverse	GGA TTG AGC TCA CAC ACC T
BMP-2	Forward	GAC GTT GGT CAA CTC TGT TAA C
	Reverse	GTC AAG GTA CAG CAT CGA GAT A
PPAR γ	Forward	AGA TCA TTT ACA CAA TGC TGG C
	Reverse	TAA AGT CAC CAA AAG GCT TTC G
GAPDH	Forward	GTA TCG TGG AAG GAC TCA TGA C
	Reverse	ACC ACC TTC TTG ATG TCA TCA T

1.10 统计分析

采用SPSS 19.0软件统计并分析, 各组数据均采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 每组处理平行重复3次, 组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

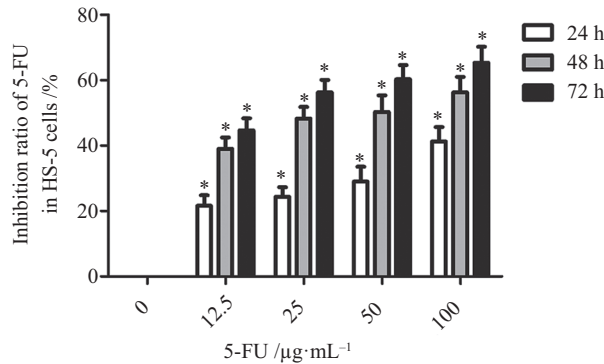
2.1 5-FU抑制HS-5细胞生长

CCK-8检测结果表明, 随着5-FU浓度的升高以及处理时间的延长, 细胞抑制率明显升高(图1, $n=3$)。提示化疗药物5-FU对人骨髓基质细胞株HS-5有损伤

作用, 抑制细胞生长。后续实验选择25 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU作用HS-5细胞48 h。

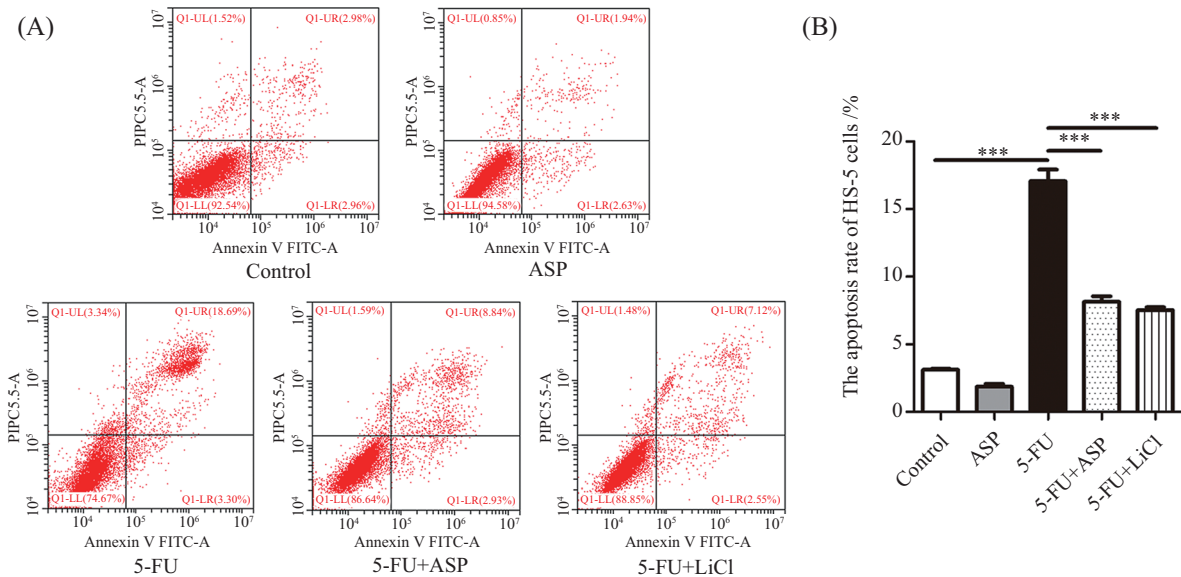
2.2 ASP减轻5-FU诱导的HS-5细胞凋亡

流式细胞术检测各组HS-5细胞凋亡水平, LL代表正常活细胞, UL代表死亡细胞, LR代表早期凋亡细胞, UR代表晚期凋亡细胞(图2A)。结果显示, 相比对照组, 经5-FU诱导后的HS-5细胞凋亡率显著上升($P<0.001, n=3$)。相比5-FU组, 经ASP预处理后, 细胞凋亡率明显下降($P<0.001, n=3$, 图2B)。结果提示, 5-FU抑制骨髓基质细胞增殖与5-FU诱发凋亡有关, ASP可拮抗5-FU所致的细胞损伤。



未经5-FU处理作为本实验对照组。* $P<0.05$, 与未经5-FU处理的细胞比较; $n=3$ 。
HS-5 cells treated without 5-FU was used as a control. * $P<0.05$ compared with the group without 5-FU; $n=3$.

图1 5-FU抑制HS-5细胞生长
Fig.1 5-FU inhibits HS-5 cells growth



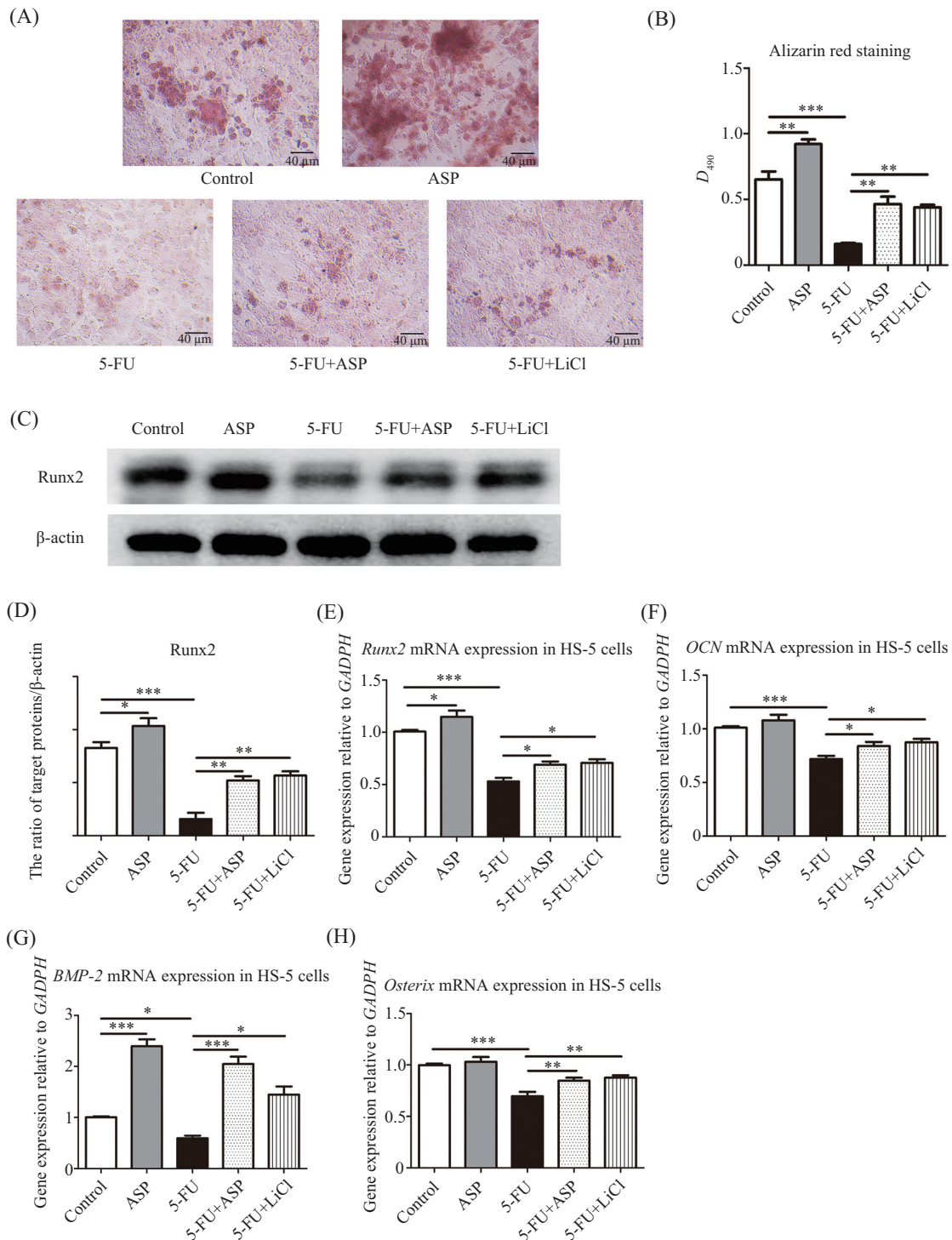
A: 流式细胞术检测HS-5凋亡; B: 凋亡细胞比率。*** $P<0.001; n=3$ 。
A: flow cytometry was used to detect apoptosis of HS-5 cells; B: the apoptosis rate of HS-5 cell. *** $P<0.001; n=3$.

图2 ASP减轻5-氟尿嘧啶诱导的HS-5细胞凋亡
Fig.2 ASP reduces apoptosis of HS-5 cells induced by 5-FU

2.3 ASP促进骨髓基质细胞成骨分化

显微镜下观察茜素红染色结果显示, 相比对照组, 5-FU组成骨结节明显减少; ASP组的成骨结节数

量增多体积增大。细胞经ASP预处理后, 与5-FU组相比, 有少量成骨结节出现, 效果与LiCl组相当(图3A)。异丙醇溶解茜素红染液, 酶标仪检测D值定量



A: 茜素红染色; B: 茜素红染色定量分析; C: Western blot检测Runx2蛋白; D: Runx2蛋白半定量分析; E-H: 成骨相关因子mRNA表达分析。**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *n*=3。

A: alizarin red staining; B: quantitative analysis of alizarin red staining; C: Runx2 protein detected by Western blot assay; D: semi-quantitative analysis of Runx2 protein; E-H: analysis of mRNA expression of osteogenic related factors. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *n*=3.

图3 ASP保护5-氟尿嘧啶作用后HS-5细胞的成骨分化能力

Fig.3 ASP protects osteogenesis potential of HS-5 cells after treatment of 5-FU

分析结果与镜下结果趋势相同(图3B)。Western blot和RT-PCR结果显示,5-FU作用后HS-5细胞表达成骨转录因子显著降低($P<0.001$, $n=3$);5-FU+ASP组较5-FU组成骨转录因子表达明显升高($P<0.01$, $n=3$);Runx2蛋白表达回升(图3C和图3D),Runx2、OCN、BMP-2以及Osterix mRNA表达均升高(图3E~图3H)。综合以上结果提示,5-FU抑制骨髓基质细胞生长、诱发凋亡的同时还抑制骨髓基质幼稚细胞朝成骨方向分化的能力,ASP可逆转5-FU损伤,具有保护骨髓基质幼稚细胞的成骨分化能力,维持造血微环境的稳定性。

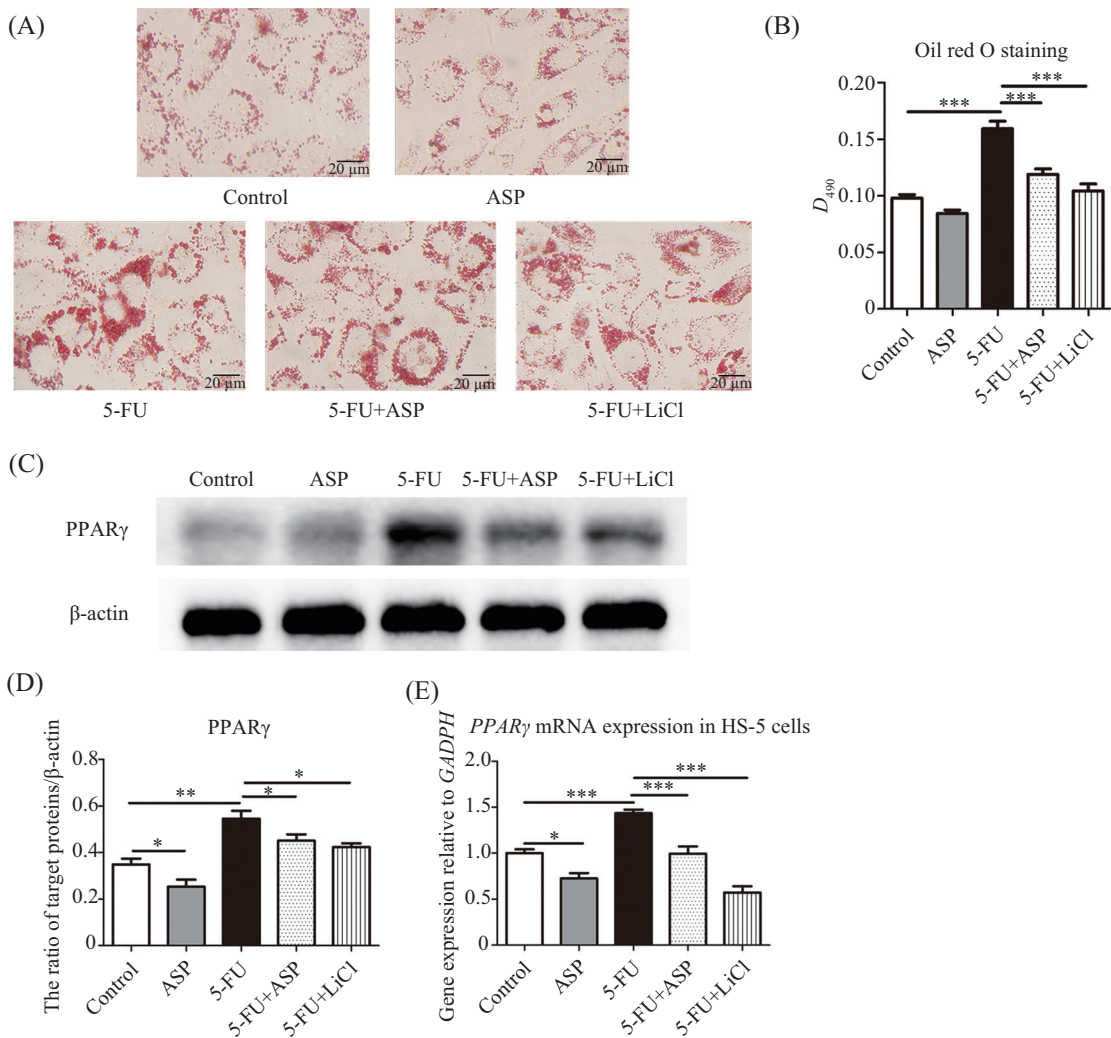
2.4 ASP抑制HS-5细胞成脂分化

显微镜下观察油红O染色结果显示,5-FU组出

现脂滴的细胞数量增多,细胞质内脂滴明显增多体积增大;ASP组和对照组类似,没有产生明显脂滴。与5-FU组相比,经ASP和LiCl预处理后,出现脂滴的HS-5细胞数量显著下降,胞质内脂滴明显减少(图4A)。异丙醇溶解油红O染液,酶标仪检测D值定量分析结果与镜下结果趋势相同($P<0.001$, $n=3$)(图4B)。5-FU组PPAR γ 蛋白和核酸水平表达均升高;ASP预处理后相比5-FU组,PPAR γ 表达降低(图4C~图4E)。提示5-FU能促使HS-5细胞中的油脂细胞朝脂肪细胞方向分化,ASP可逆转损伤HS-5细胞的成脂分化方向。

2.5 ASP调控 β -catenin信号

β -catenin为Wnt/ β -catenin信号通路的关键效应

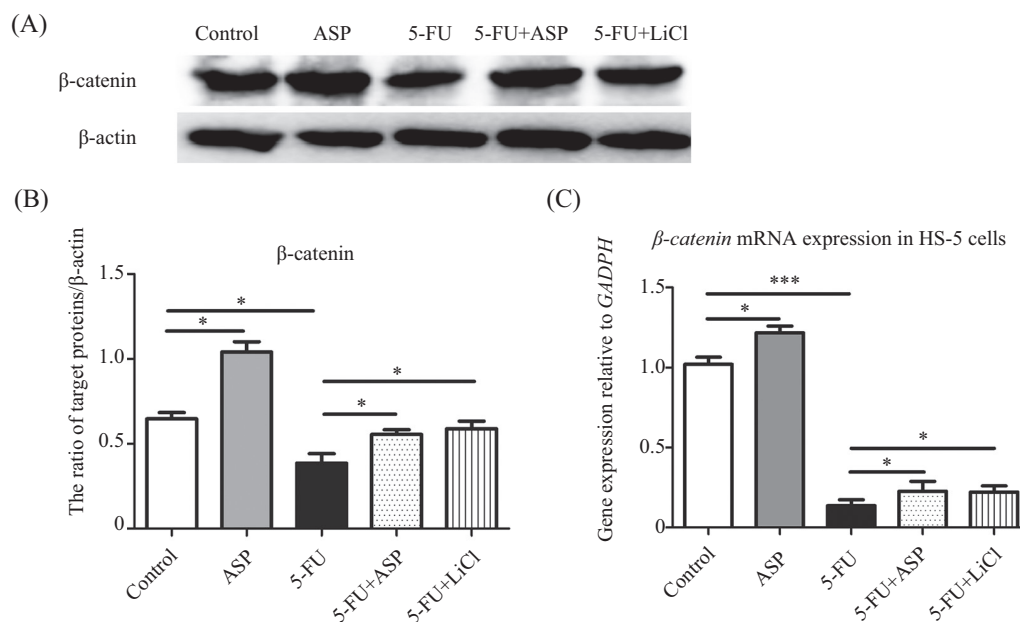


A: 油红O染色; B: 油红O染色定量分析; C: Western blot检测PPAR γ 蛋白; D: PPAR γ 蛋白半定量分析; E: PPAR γ mRNA表达分析。* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; $n=3$ 。

A: oil red O staining; B: quantitative analysis of oil red O staining; C: PPAR γ protein detected by Western blot assay; D: semi-quantitative analysis of PPAR γ protein; E: analysis of mRNA expression of PPAR γ . * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; $n=3$.

图4 ASP抑制5-氟尿嘧啶作用后的HS-5细胞成脂分化

Fig.4 ASP inhibits adipogenic differentiation of HS-5 cells after treatment of 5-FU



A: Western blot检测β-catenin蛋白; B: β-catenin蛋白半定量分析; C: β-catenin mRNA表达分析。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; $n = 3$ 。

A: β-catenin protein detected by Western blot assay; B: semi-quantitative analysis of β-catenin protein; C: analysis of mRNA expression of β-catenin. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; $n = 3$ 。

图5 ASP拮抗5-FU调控HS-5细胞β-catenin信号表达

Fig.5 ASP antagonize 5-FU to regulate β-catenin signaling in HS-5 cells

物, 实验进一步检测5-FU和ASP是否通过β-catenin调控HS-5幼稚细胞的成骨与成脂分化方向。Western blot结果显示, 相比对照组, 5-FU组β-catenin蛋白表达减少, ASP组表达升高; 经ASP预处理后, 相比5-FU组, β-catenin蛋白表达回升($P < 0.05$, $n = 3$)(图5A和5B)。β-catenin mRNA的表达与蛋白表达结果趋势一致(图5C)。结果提示, 5-FU抑制成骨分化能力、驱使骨髓基质幼稚细胞朝成脂方向发展, 可能与下调骨髓基质细胞Wnt/β-catenin信号有关; 而ASP可以激活此信号, 部分恢复HS-5朝成骨方向分化的潜能。

3 讨论

化疗作为临床治疗肿瘤的主要手段, 对骨髓具有毒副作用, 通过引起造血祖细胞的损伤可导致急性骨髓抑制的发生, 然而一旦损伤BMSCs以及造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSCs)则发展成为长期潜在的骨髓抑制, 严重影响骨髓造血功能^[18]。骨内膜龕主要由成骨系细胞, 间充质干细胞、内皮细胞和CAR细胞等基质细胞以及细胞因子、细胞外基质和黏附分子构成HSCs赖以生存的微环境^[19], 调控造血干/祖细胞定居、增殖、分化。其中成骨系细胞在维持造血功能上起着首要作用。早期成骨细胞合成分泌可溶性或膜包被性因子, 包括基质衍

生因子-1(stromal derived factor-1, SDF-1/CXCL12)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、血管生成素(angiotropin-1, Ang1)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)以及N-钙连蛋白和LFA-1(leucocyte function-associated antigen-1)等黏附分子, 与HSCs上的受体结合, 使HSCs保持自我更新、多向分化的干细胞特性^[20-21]。尽管脂肪细胞对造血的调控作用目前尚存在争议, 但多数证据表明, 脂肪细胞对造血有负调控作用。稳态情况下骨髓内HSCs定居于骨内膜龕; 伴随老年红骨髓被黄骨髓代替, 部分HSCs发生衰老, 造血应激潜能减退; NAVEL-RAS等^[22]发现, 在小鼠骨髓的不同区域, 脂肪细胞的数量与HSCs数量、造血活性成反比; 放化疗后2周内伴随骨髓腔内脂肪细胞增多造血机能减退; 不含骨髓脂肪的转基因小鼠经辐射后显示出增强的造血恢复能力; 骨髓脂肪细胞可通过激活Neuropilin-1蛋白下调HSCs表达CXCR4, 从而抑制SDF-1/CXCR4信号转导, 导致HSCs归巢和移植减少^[23]。成骨细胞和脂肪细胞的前体细胞均为间充质干细胞, 且两种分化方向之间保持着动态平衡, 维持造血微环境稳态^[24]。活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是调控基质前体细胞成骨/成脂分化的重要因素。ROS升高, 激活ROS下游转录因子PPAR γ , 促进其与C/EBP α 形

成复合物,进一步促进成脂基因表达;而ROS降低时PPAR γ 受抑制,转录因子Runx2和Osterix激活,促进成骨分化^[25-26]。既往实验证实,老龄化、女性绝经期雌激素下降,放疗、肿瘤化疗药物阿霉素、依托泊苷、甲氨蝶呤等多种因素均会导致BMSCs氧化应激增加,引起骨髓骨小梁减少和髓内脂肪化^[27-28]。

课题组既往研究表明,化疗药物5-FU可导致BMSCs发生氧化应激DNA损伤,伴随超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶合成减少,脂氧化产物MDA和ROS含量增加^[29]。5-FU引起的氧化应激是否会导致骨髓间充质细胞分化潜能发生改变,通过成骨系和成脂方向细胞群数量及生物活性的改变影响造血功能,这是本研究关注的焦点。研究发现,5-FU抑制HS-5细胞生长、诱发细胞凋亡的同时,抑制细胞朝成骨方向分化促进成脂方向分化。结合课题组前期实验结果,基质细胞经5-FU作用后SDF、SCF因子分泌被抑制,而这两种关键正向造血因子主要由成骨细胞分泌^[13]。综合以上实验证据,可以推断5-FU引起的造血微环境氧化应激会导致BMSCs成骨分化与成脂分化失衡,分化偏移,骨髓腔内脂肪细胞增多、成骨系细胞减少,分泌生物活性物质改变,最终导致骨髓造血功能减退。

经典Wnt信号通路激活可刺激骨髓基质细胞增殖,促进基质前体细胞成骨方向分化,通过与Notch信号通路对话促进HSCs自我更新,维持长期重建HSCs^[20]。值得关注的是,Wnt信号维持HSCs自我更新的功能是骨髓基质依赖的。已有研究表明,在氧化应激的情况下,激活的FOXO信号抑制Wnt信号通路,导致 β -catenin无法入细胞核内与TCF/LEF结合,影响下游Runx2、Osterix等靶基因的转录,进而抑制成骨分化^[30]。课题组前期实验证实,由于氧化应激5-FU下调Wnt/ β -catenin信号通路,抑制骨髓基质细胞增殖^[29]。本实验进一步发现,5-FU可能通过下调骨髓基质细胞 β -catenin表达从而抑制成骨相关转录因子转录与表达,同时促进成脂相关转录因子转录与表达。

当归(*Angelica sinensis*)是祖国传统医学中用于“补血活血”的良药,当归的有效药用成分为ASP,具有明确的抗氧化、抗炎、促造血、调控免疫等生物学活性^[31]。既往实验证实,ASP可通过减轻细胞氧化应激水平,拮抗氧化DNA损伤从而减轻5-FU对BMSCs的损伤,同时促进造血刺激因子分泌,减轻

造血细胞氧化应激性早衰^[13],而ASP对于骨髓基质细胞和造血细胞的保护作用是否与ASP调节BMSCs成骨与成脂分化潜能、稳定骨内膜龛相关尚不清楚。本实验发现,经ASP预处理的化疗损伤细胞成骨分化能力回升,成脂方向分化受到抑制。利用Wnt/ β -catenin信号通路激活剂LiCl作为阳性对照,结果提示,ASP保护化疗损伤后骨髓基质细胞的成骨分化潜能,可能与ASP激活Wnt/ β -catenin信号通路调控骨髓基质细胞成骨成脂分化相关因子的表达有关。我们推测,ASP可以改善化疗后成骨成脂分化方向偏移,本实验为预防和保护化疗药物诱导的骨髓抑制提供新的思路。

参考文献 (References)

- [1] CORONADO-CERDA E E, FRANCO-MOLINA M A, MENDOZA-GAMBOA E, et al. *In vivo* chemoprotective activity of bovine dialyzable leukocyte extract in mouse bone marrow cells against damage induced by 5-fluorouracil [J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 6942321.
- [2] SHAIKH A, BHARTIYA D, KAPOOR S, et al. Delineating the effects of 5-fluorouracil and follicle-stimulating hormone on mouse bone marrow stem/progenitor cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 59.
- [3] TAMMA R, RIBATTI D. Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1.
- [4] NAKAMURA Y, ARAI F, IWASAKI H, et al. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2010, 116(9): 1422-32.
- [5] AMBROSI T H, SCIALDONE A, GRAJA A, et al. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(6): 771-84.e6.
- [6] ZHU R J, WU M Q, LI Z J, et al. Hematopoietic recovery following chemotherapy is improved by BADGE-induced inhibition of adipogenesis [J]. *Int J Hematol*, 2013, 97(1): 58-72.
- [7] LU W, WANG W, WANG S, et al. Rosiglitazone promotes bone marrow adipogenesis to impair myelopoiesis under stress [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149543.
- [8] GEORGIOU K R, SCHERER M A, FAN C M, et al. Methotrexate chemotherapy reduces osteogenesis but increases adipogenic potential in the bone marrow [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(3): 909-18.
- [9] KOBAYASHI Y, UEHARA S, UDAGAWA N, et al. Regulation of bone metabolism by Wnt signals [J]. *J Biochem*, 2016, 159(4): 387-92.
- [10] KIM J H, LIU X, WANG J, et al. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013, 5(1): 13-31.
- [11] CAWTHORN W P, BREE A J, YAO Y, et al. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism [J]. *Bone*, 2012, 50(2): 477-89.

- [12] CASE N, RUBIN J. Beta-catenin-a supporting role in the skeleton [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(3): 545-53.
- [13] XIAO H, XIONG L, SONG X, et al. *Angelica sinensis* polysaccharides ameliorate stress-induced premature senescence of hematopoietic cell via protecting bone marrow stromal cells from oxidative injuries caused by 5-fluorouracil [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 11.
- [14] 熊丽溶, 宋小英, 景鹏伟, 等. 当归多糖延缓5-氟尿嘧啶所致人骨髓基质细胞衰老[J]. *基因组学与应用生物学*(XIONG L, SONG X, JING P, et al. *Angelica sinensis* polysaccharide delayed 5-fluorouracil-induced senescence of human bone marrow stromal cells [J]. *Genomics and Applied Biology*), 2017, 36(5): 1775-82.
- [15] RAFFAELE M, BARBAGALLO I, LICARI M, et al. N-acetylcysteine (NAC) ameliorates lipid-related metabolic dysfunction in bone marrow stromal cells-derived adipocytes [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 5310961.
- [16] WAN S, LIU Y, WENG Y, et al. BMP9 regulates cross-talk between breast cancer cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2014, 37(5): 363-75.
- [17] CHOI D H, SUHAERI M, HWANG M P, et al. Multi-lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells on the biophysical microenvironment of cell-derived matrix [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(3): 781-92.
- [18] GEORGIOU K R, KING T J, SCHERER M A, et al. Attenuated Wnt/beta-catenin signalling mediates methotrexate chemotherapy-induced bone loss and marrow adiposity in rats [J]. *Bone*, 2012, 50(6): 1223-33.
- [19] MORI S, HIDAKA M, KAWAKITA T, et al. Factors Associated with myelosuppression related to low-dose methotrexate therapy for inflammatory rheumatic diseases [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154744.
- [20] KIEL M J, MORRISON S J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(4): 290-301.
- [21] LI G, LIU J, WANG Y, et al. LNGFR targets the Wnt/beta-catenin pathway and promotes the osteogenic differentiation in rat ectomesenchymal stem cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11021.
- [22] NAVEIRAS O, NARDI V, WENZEL P L, et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment [J]. *Nature*, 2009, 460(7252): 259-63.
- [23] GUERRA D A P, PAIVA A E, SENA I F G, et al. Adipocytes role in the bone marrow niche [J]. *Cytometry A*, 2018, 93(2): 167-71.
- [24] CHEN Q, SHOU P, ZHENG C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts[J]? *Cell Death Differ*, 2016, 23(7): 1128-39.
- [25] ATASHI F, MODARRESSI A, PEPPER M S. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(10): 1150-63.
- [26] TINTUT Y, DEMER L L. Effects of bioactive lipids and lipoproteins on bone [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(2): 53-9.
- [27] RENDINA-RUEDY E, ROSEN C J. Bone-fat interaction [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2017, 46(1): 41-50.
- [28] LI C J, CHENG P, LIANG M K, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1509-22.
- [29] 肖含先之, 齐嵘嘉, 汪子铃, 等. 5-氟尿嘧啶通过下调Wnt/ β -catenin信号通路抑制骨髓基质细胞增殖[J]. *中国细胞生物学学报*(XIAO H X Z, QI R, WANG Z, et al. 5-Fluorouracil inhibits proliferation of bone marrow stromal cells via down-regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(6): 1059-66.
- [30] IYER S, AMBROGINI E, BARTELL S M, et al. FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(8): 3409-19.
- [31] NIU X, ZHANG J, LING C, et al. Polysaccharide from *Angelica sinensis* protects H9c2 cells against oxidative injury and endoplasmic reticulum stress by activating the ATF6 pathway [J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(5): 1717-33.