

# 地佐辛对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化及对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响<sup>△</sup>

宋琳琳<sup>1\*</sup>, 孙娜<sup>1</sup>, 王震生<sup>1</sup>, 魏新运<sup>2</sup>(1. 衡水市第二人民医院麻醉科, 河北衡水 053000; 2. 衡水市第二人民医院骨科, 河北衡水 053000)

中图分类号 R971<sup>+</sup>.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)08-0939-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.08.010

**摘要** 目的:探讨地佐辛对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化及对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响。方法:使用质量浓度为 0、5、10、20、40 和 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的地佐辛处理 MC3T3-E1 细胞 48 h 后,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞存活率,计算半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。将 MC3T3-E1 细胞分为对照组、地佐辛低浓度组(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、地佐辛中浓度组(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、地佐辛高浓度组(40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和地佐辛高浓度+氯化锂(LiCl)组(40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ +20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),采用 CCK-8 检测细胞存活率;碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒检测细胞 ALP 活性;茜素红染色检测细胞钙化结节;蛋白质印迹法检测细胞中成骨分化相关蛋白[Runt 相关转录因子 2(RUNX2)、骨桥蛋白(OPN)和骨钙素(OCN)]及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白(Wnt3a、 $\beta$ -catenin)表达水平。结果:MC3T3-E1 细胞对地佐辛的  $\text{IC}_{50}$  约为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;与对照组比较,地佐辛低、中及高浓度组细胞存活率、ALP 活性和钙化结节数目,RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平依次降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与地佐辛高浓度组比较,地佐辛高浓度+LiCl 组细胞存活率、ALP 活性和钙化结节数目,RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:地佐辛可通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来抑制成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖、分化。

**关键词** 地佐辛;成骨细胞 MC3T3-E1;增殖;分化;Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

## Effects of Dezocine on the Proliferation and Differentiation of Osteoblasts MC3T3-E1 and the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signal Pathway<sup>△</sup>

SONG Linlin<sup>1</sup>, SUN Na<sup>1</sup>, WANG Zhensheng<sup>1</sup>, WEI Xinyun<sup>2</sup>(1. Dept. of Anesthesiology, Hengshui Second People's Hospital, Hebei Hengshui 053000, China; 2. Dept. of Orthopaedics, Hengshui Second People's Hospital, Hebei Hengshui 053000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To probe into the effects of dezocine on the proliferation and differentiation of osteoblasts MC3T3-E1 and the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **METHODS:** MC3T3-E1 cells were treated with dezocine at concentrations of 0, 5, 10, 20, 40 and 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 hours, cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell survival rate and calculate the half inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ). MC3T3-E1 cells were divided into control group, dezocine low concentration group (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), dezocine medium concentration group (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), dezocine high concentration group (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and dezocine high concentration+ lithium chloride (LiCl) group (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ +20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), the CCK-8 was used to detect cell survival rate; alkaline phosphatase (ALP) detection kit was used to detect the ALP activity; the alizarin red staining was used to detect cellular calcified nodules; the Western blot was used to detect the expression levels of osteogenic differentiation related protein [Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN)] and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway related proteins (Wnt3a,  $\beta$ -catenin) in the cells. **RESULTS:** The  $\text{IC}_{50}$  of MC3T3-E1 cells to dezocine was about 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; compared with the control group, the cell survival rate, ALP activity, number of calcified nodules, expression levels of RUNX2, OPN, OCN, Wnt3a and  $\beta$ -catenin protein in dezocine low, medium and high concentration groups were decreased successively, with statistically significant difference ( $P < 0.05$ ); compared with dezocine high concentration group, the cell survival rate, ALP activity, number of calcified nodules, the expression levels of RUNX2, OPN, OCN, Wnt3a and  $\beta$ -catenin protein in dezocine high concentration+LiCl group were significantly higher, with statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Dezocine can inhibit the proliferation and differentiation of osteoblasts MC3T3-E1 by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**KEYWORDS** Dezocine; Osteoblasts MC3T3-E1; Proliferation; Differentiation; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

<sup>△</sup> 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(No. 20201211)

\* 主治医师。研究方向:麻醉作用机制的研究。E-mail:songlinlin982@163.com

骨质疏松症是一种容易引起脆性骨折和慢性致残性疼痛的疾病,在老年人和绝经后妇女中发生率较高,主要表现为骨量减少和骨骼退化,由破骨细胞和成骨细胞介导的骨吸收与骨形成之间的协调平衡失调引起,研究成骨细胞的增殖、分化对骨质疏松症的治疗具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。地佐辛为强效阿片类镇痛药,在围手术期使用广泛,其在骨折手术中具有有良好的镇痛效果<sup>[3]</sup>。但地佐辛对骨折后愈合及成骨细胞分化是否有影响尚未可知。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导通路参与调控成骨细胞的增殖、分化,在骨形成过程中发挥重要作用,研究结果显示,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活,可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化<sup>[4-5]</sup>。目前,有关地佐辛在成骨细胞 MC3T3-E1 中的作用研究尚未见报道。因此,本研究探讨了地佐辛对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化及对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响,现报告如下。

## 1 材料

### 1.1 实验细胞

小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 购自上海拜力生物科技有限公司,批号为 BL-1029R。

### 1.2 仪器

DKW-310 型酶标仪、BX51-P 型显微镜和 ChemiDoc 型凝胶成像仪均购自厦门赛多利仪器有限公司。

### 1.3 药品与试剂

地佐辛注射液(规格为 1 mL:5 mg,批号为 20210617)购自扬子江药业集团有限公司;DMEM 培养基(批号为 GUXMD-50029)、矿化诱导培养基(批号为 GUXMD-10058)、茜素红染色试剂盒(批号为 GUXMD-20154)和 RIPA 裂解液(批号为 GUXMD-29147)均购自赛业(苏州)生物科技有限公司;细胞计数试剂盒-8(CCK-8,批号为 JL41527)、Wnt/ $\beta$ -catenin 通路激活剂氯化锂(LiCl,批号为 JL58179)、碱性磷酸酶(ALP)显色液试剂盒(批号为 JL10237)、聚乙二醇辛基苯基醚(批号为 JL20875)和 ALP 检测试剂盒(批号为 JL47127)均购自上海江莱生物科技有限公司;兔抗鼠 Runt 相关转录因子 2(RUNX2,批号为 ab9012)、骨桥蛋白(OPN,批号为 ab6027)、骨钙素(OCN,批号为 ab3074)、Wnt3a(批号为 ab3098)、 $\beta$ -catenin(批号为 ab60121)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin,批号为 ab10563)单克隆抗体和兔抗鼠二抗(批号为 ab10028)均购自美国 Abcam 公司。

## 2 方法

### 2.1 CCK-8 检测不同浓度地佐辛对 MC3T3-E1 细胞存活率的影响

将 MC3T3-E1 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中进行培养,细胞融合至约 80% 时,使用质量浓度为 0、5、10、20、40 和 80  $\mu$ g/mL 的地佐辛处理细胞,在 96 孔板中培养 48 h,每孔加入 CCK-8 试剂,继续培养 1.5 h,检测酶标仪 450 nm 处的吸光度(OD)值,计算细胞存活率[细胞存活率=各浓度地佐辛组 OD 值/(0  $\mu$ g/mL 地佐辛组 OD 值) $\times$ 100%],绘制生长曲线,计算细胞对地佐辛的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。每组设 6 个平行样。

### 2.2 细胞分组及处理

待 MC3T3-E1 细胞生长至对数生长期,将 MC3T3-E1 细胞

分为 5 组,分别为对照组、地佐辛低浓度组、地佐辛中浓度组、地佐辛高浓度组和地佐辛高浓度+LiCl 组。其中,对照组正常培养 MC3T3-E1 细胞;地佐辛低、中及高浓度组分别使用 10、20 及 40  $\mu$ g/mL 的地佐辛处理 MC3T3-E1 细胞;地佐辛高浓度+LiCl 组使用 40  $\mu$ g/mL 的地佐辛和 20  $\mu$ mol/L 的 LiCl<sup>[6]</sup> 处理 MC3T3-E1 细胞。每组设 6 个平行样。

### 2.3 CCK-8 检测细胞存活率

将各组处理的 MC3T3-E1 细胞接种于 96 孔板中,培养 48 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,孵育 1.5 h 后检测酶标仪 450 nm 处的 OD 值,计算细胞存活率(细胞存活率=实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times$ 100%)。

### 2.4 ALP 活性检测

将各组处理的 MC3T3-E1 细胞接种于 6 孔板中,培养 7 d 后,弃去培养液,以 PBS 清洗 3 次,用 4% 多聚甲醛固定 10 min,加入 ALP 显色液,避光染色 20 min,显微镜下观察颜色变化并拍照。另取处理 48 h 后的各组 MC3T3-E1 细胞,以 PBS 洗涤后,使用 0.1% 的聚乙二醇辛基苯基醚冰上裂解细胞 10 min,将裂解液反复冻融 3 次,离心收集上清液,按照 ALP 检测试剂盒操作方法检测 ALP 活性。

### 2.5 茜素红染色检测细胞钙化结节

将不同处理组的 MC3T3-E1 细胞调整成密度为  $2\times 10^5$  个/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔板中,在矿化诱导培养基(含 100 nmol/L 维生素 C、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠和 7 mol/L 地塞米松)中诱导培养 21 d,以 PBS 洗涤细胞,使用 95% 乙醇固定 15 min,再加入 0.1% 茜素红染色 30 min,显微镜下观察并拍照,随机取 6 个视野观察钙化结节,计算平均值。

### 2.6 蛋白质印迹法检测细胞中成骨分化相关蛋白(RUNX2、OPN 和 OCN)及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白(Wnt3a、 $\beta$ -catenin)表达

不同处理组的 MC3T3-E1 细胞培养 48 h 后,使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,定量蛋白浓度后,取 20  $\mu$ g 蛋白与上样缓冲液煮沸变性后,电泳转膜,分别加入兔抗鼠 RUNX2(1:300)、OPN(1:300)、OCN(1:500)、Wnt3a(1:1 000)、 $\beta$ -catenin(1:1 000)和  $\beta$ -actin(1:1 000)单克隆抗体,室温(25  $^{\circ}$ C)孵育 24 h,再加入二抗(1:3 000),室温孵育 1 h,ECL 显色,以  $\beta$ -actin 为内参,通过 Image 软件分析各蛋白相对表达量。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度地佐辛对 MC3T3-E1 细胞存活率的影响

使用质量浓度为 0、5、10、20、40 和 80  $\mu$ g/mL 的地佐辛分别处理 MC3T3-E1 细胞 48 h 后,随着地佐辛浓度的增加,MC3T3-E1 细胞存活率逐渐降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。经计算,细胞的 IC<sub>50</sub> 约为 20  $\mu$ g/mL,因此选择 10、20 和 40  $\mu$ g/mL 的浓度作为后续实验的地佐辛低、中和高浓度,见表 1。

表 1 不同浓度地佐辛对 MC3T3-E1 细胞存活率的影响 ( $\bar{x}\pm s, \%, n=6$ )

Tab 1 Effects of different concentrations of dezocine on the survival rate of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x}\pm s, \%, n=6$ )

组别	细胞存活率
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地佐辛组	100.00 $\pm$ 0.00
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地佐辛组	90.07 $\pm$ 6.12 <sup>a</sup>
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地佐辛组	72.61 $\pm$ 8.05 <sup>ab</sup>
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地佐辛组	50.41 $\pm$ 5.94 <sup>abc</sup>
40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地佐辛组	31.09 $\pm$ 4.07 <sup>abcd</sup>
80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地佐辛组	18.47 $\pm$ 3.83 <sup>abcde</sup>

注:与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地佐辛组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地佐辛组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地佐辛组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地佐辛组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地佐辛组比较,<sup>e</sup> $P<0.05$

Note:zs. 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dezocine group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; zs. 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dezocine group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; zs. 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dezocine group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; zs. 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dezocine group, <sup>d</sup> $P<0.05$ ; zs. 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dezocine group, <sup>e</sup> $P<0.05$

### 3.2 五组 MC3T3-E1 细胞存活率比较

与对照组比较,地佐辛低、中及高浓度组细胞存活率依次降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与地佐辛高浓度组比较,地佐辛高浓度+LiCl 组细胞存活率升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 五组 MC3T3-E1 细胞存活率比较 ( $\bar{x}\pm s, \%, n=6$ )

Tab 2 Comparison of survival rates among five groups of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x}\pm s, \%, n=6$ )

组别	细胞存活率
对照组	100.00 $\pm$ 0.00
地佐辛低浓度组	72.35 $\pm$ 7.92 <sup>a</sup>
地佐辛中浓度组	50.28 $\pm$ 5.69 <sup>ab</sup>
地佐辛高浓度组	31.14 $\pm$ 4.21 <sup>abc</sup>
地佐辛高浓度+LiCl 组	86.37 $\pm$ 8.05 <sup>d</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛低浓度组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛中浓度组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛高浓度组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$

Note:zs. control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine low concentration group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine medium concentration group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine high concentration group, <sup>d</sup> $P<0.05$

### 3.3 五组 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性比较

与对照组比较,地佐辛低、中及高浓度组细胞 ALP 活性依次降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),ALP 染色变浅;与地佐辛高浓度组比较,地佐辛高浓度+LiCl 组细胞 ALP 活性升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),ALP 染色变浅变深,见图 1、表 4。

表 3 五组 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性比较 ( $\bar{x}\pm s, \text{U/gprot}, n=6$ )

Tab 3 Comparison of ALP activity among five groups of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x}\pm s, \text{U/gprot}, n=6$ )

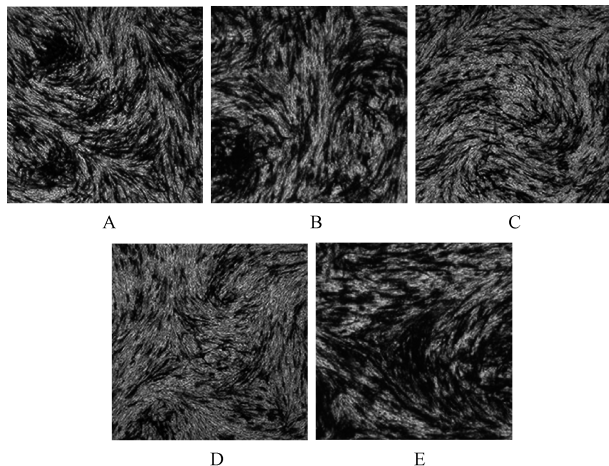
组别	ALP 活性
对照组	10.76 $\pm$ 2.35
地佐辛低浓度组	8.33 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>
地佐辛中浓度组	6.05 $\pm$ 1.13 <sup>ab</sup>
地佐辛高浓度组	3.97 $\pm$ 0.76 <sup>abc</sup>
地佐辛高浓度+LiCl 组	9.01 $\pm$ 1.83 <sup>d</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛低浓度组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛中浓度组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛高浓度组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$

Note:zs. control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine low concentration group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine medium concentration group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine high concentration group, <sup>d</sup> $P<0.05$

### 3.4 五组 MC3T3-E1 细胞钙化结节比较

与对照组比较,地佐辛低、中及高浓度组细胞钙化结节数目依次降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),钙化结节染色变浅;与地佐辛高浓度组比较,地佐辛高浓度+LiCl 组细胞钙化结节数目升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),钙化结节染



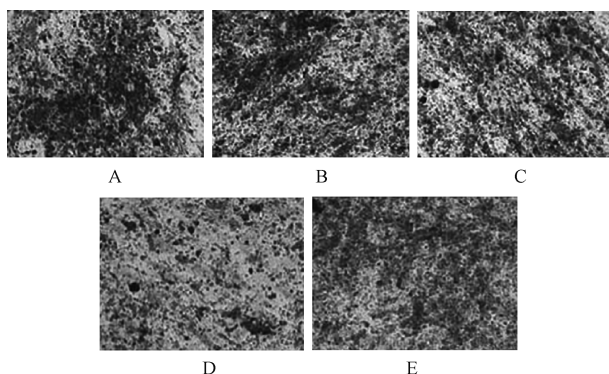
A. 对照组;B. 地佐辛低浓度组;C. 地佐辛中浓度组;D. 地佐辛高浓度组;E. 地佐辛高浓度+LiCl 组

A. control group; B. dezocine low concentration group; C. dezocine medium concentration group; D. dezocine high concentration group; E. dezocine high concentration+LiCl group

图 1 五组 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性 (ALP 染色,  $\times 200$ )

Fig 1 ALP activity of five groups of MC3T3-E1 cells (ALP staining,  $\times 200$ )

色变深,见图 2、表 4。



A. 对照组;B. 地佐辛低浓度组;C. 地佐辛中浓度组;D. 地佐辛高浓度组;E. 地佐辛高浓度+LiCl 组

A. control group; B. dezocine low concentration group; C. dezocine medium concentration group; D. dezocine high concentration group; E. dezocine high concentration+LiCl group

图 2 五组 MC3T3-E1 细胞钙化结节比较 (茜素红染色,  $\times 200$ )

Fig 2 Comparison of calcified nodules among five groups of MC3T3-E1 cells (alizarin red staining,  $\times 200$ )

表 4 五组 MC3T3-E1 细胞钙化结节数目比较 ( $\bar{x}\pm s, \text{个}, n=6$ )

Tab 4 Comparison of the numbers of calcified nodules among five groups of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x}\pm s, \text{counts}, n=6$ )

组别	钙化结节数目/个
对照组	25.56 $\pm$ 3.12
地佐辛低浓度组	21.73 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>
地佐辛中浓度组	18.06 $\pm$ 1.98 <sup>ab</sup>
地佐辛高浓度组	13.36 $\pm$ 1.57 <sup>abc</sup>
地佐辛高浓度+LiCl 组	23.25 $\pm$ 2.03 <sup>d</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛低浓度组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛中浓度组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与地佐辛高浓度组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$

Note:zs. control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine low concentration group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine medium concentration group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; zs. dezocine high concentration group, <sup>d</sup> $P<0.05$

### 3.5 五组 MC3T3-E1 细胞 RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平比较

与对照组比较,地佐辛低、中及高浓度组细胞 RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平依次降低,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与地佐辛高浓度组比较,地佐辛高浓度+LiCl 组细胞 RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 3、表 5。

## 4 讨论

地佐辛为新型受体激动-拮抗剂,无明显的呼吸抑制和药物依赖性,具有良好的抗炎、镇痛、镇静和调节免疫作用,在骨折手术中应用广泛<sup>[7-9]</sup>。有研究结果显示,地佐辛可抑制  $\beta$  淀粉样多肽处理的原代大鼠皮质星形胶质细胞凋亡<sup>[10]</sup>。本研究使用 5~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的地佐辛处理 MC3T3-E1 细胞 48 h 后,结果显示,随着地佐辛浓度的升高,MC3T3-E1 细胞存活率逐渐降低,表明地佐辛对 MC3T3-E1 细胞的增殖具有抑制作用。通过

表 5 五组 MC3T3-E1 细胞 RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab 5 Comparison of expression levels of RUNX2, OPN, OCN, Wnt3a and  $\beta$ -catenin protein among five groups of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

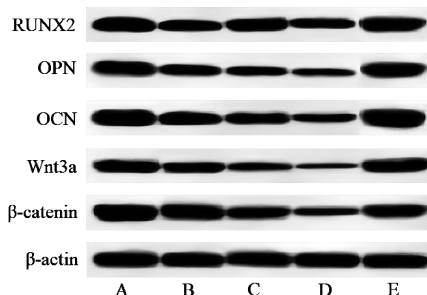
组别	RUNX2/ $\beta$ -actin	OPN/ $\beta$ -actin	OCN/ $\beta$ -actin	Wnt3a/ $\beta$ -actin	$\beta$ -catenin/ $\beta$ -actin
对照组	1.25 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.12	1.37 $\pm$ 0.16	1.05 $\pm$ 0.11	1.21 $\pm$ 0.14
地佐辛低浓度组	1.09 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
地佐辛中浓度组	0.91 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.73 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.82 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.76 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
地佐辛高浓度组	0.65 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>abc</sup>	0.53 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>abc</sup>
地佐辛高浓度+LiCl 组	1.03 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	0.98 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	1.21 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>	0.91 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	1.05 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与地佐辛低浓度组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与地佐辛中浓度组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与地佐辛高浓度组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

Note:zs. control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; zs. dezocine low concentration group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; zs. dezocine medium concentration group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; zs. dezocine high concentration group, <sup>d</sup> $P < 0.05$

计算得出细胞的  $\text{IC}_{50}$  约为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,因此选择 10、20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为后续实验浓度。研究结果显示,地佐辛通过靶向调控蛋白激酶 B1/糖原合成酶激酶-3 $\beta$  通路调控肝癌细胞的增殖、迁移和有氧糖酵解<sup>[11]</sup>。本研究使用 10、20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的地佐辛处理 MC3T3-E1 细胞,培养 48 h 后,细胞存活率较对照组均降低,且呈浓度依赖性。ALP 为成骨细胞分化早期的标志<sup>[12]</sup>;RUNX2 能够诱导成骨细胞的分化<sup>[13]</sup>;OPN、OCN 为成骨细胞活性、组织矿化的重要指标<sup>[14]</sup>。钙化结节是成骨细胞分化的最后阶段<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,使用 10、20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的地佐辛处理 MC3T3-E1 细胞后,细胞中 ALP 活性、钙化结节数目、RUNX2、OPN 和 OCN 蛋白表达水平较对照组降低,呈浓度依赖性,且 ALP 染色和钙化结节染色变浅。以上结果表明,地佐辛可抑制 MC3T3-E1 细胞增殖与分化,但其作用机制尚不清楚。

Wnt 信号通路在骨相关疾病的发病中有重要作用,Wnt3a 可活化  $\beta$ -catenin 表达,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以通过 RUNX2 基因促进成骨的形成<sup>[16-17]</sup>。多项研究结果显示,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在成骨细胞的增殖及骨形成过程中发挥重要作用<sup>[18-19]</sup>。研究结果显示,上调 Wnt 信号转导通路,可促进成骨细胞增殖分化<sup>[20]</sup>。而抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,则抑制成骨细胞的增殖、分化<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,使用 10、20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的地佐辛处理 MC3T3-E1 细胞后,细胞中 Wnt3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平较对照组降低,且呈浓度依赖性,表明地佐辛可能抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路。另外,本研



A. 对照组;B. 地佐辛低浓度组;C. 地佐辛中浓度组;D. 地佐辛高浓度组;E. 地佐辛高浓度+LiCl 组

A. control group; B. dezocine low concentration group; C. dezocine medium concentration group; D. dezocine high concentration group; E. dezocine high concentration+LiCl group

图 3 五组 MC3T3-E1 细胞 RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 蛋白印迹图

Fig 3 Western blot diagram of RUNX2, OPN, OCN, Wnt3a and  $\beta$ -catenin of five groups of MC3T3-E1 cells

究使用 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路激活剂 LiCl 与高浓度地佐辛共同处理 MC3T3-E1 细胞后,细胞存活率、ALP 活性和钙化结节数目、RUNX2、OPN、OCN、Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平较地佐辛高浓度组升高,表明 LiCl 可逆转地佐辛对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化的抑制作用,证实地佐辛可通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,抑制成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖、分化。

综上所述,地佐辛可通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来抑制成骨细胞的增殖、分化,但本研究仅通过体外细胞实验对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白进行了初步研究,接下来将结合动物实验做更深入的研究。

## 参考文献

- [1] YOSHIDA G, KAWABATA T, TAKAMATSU H, et al. Degradation of the NOTCH intracellular domain by elevated autophagy in osteoblasts promotes osteoblast differentiation and alleviates osteoporosis [J]. *Autophagy*, 2022; 1-10. DOI: 10.1080/15548627.2021.2017587. Epub ahead of print.
- [2] 姜涛, 凌翠敏, 陈庆真, 等. 淫羊藿苷通过提高自噬促进成骨细胞分化防治骨质疏松[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(17): 2643-2649.
- [3] 孙光梅, 刘姚珍. 地佐辛预处理对老年下肢远端骨折患者术后痛觉过敏及血流动力学的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(16): 3448-3451.
- [4] JI W Q, SUN X T. Methyl-CpG-binding protein 2 promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through regulating forkhead box F1/Wnt/ $\beta$ -catenin axis[J]. *Bioengineered*,

- 2022, 13(1): 583-592.
- [5] 马忠平, 杨云, 张志峰, 等. 芝麻素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路调控大鼠骨髓间充质干细胞成骨细胞分化预防骨质疏松的作用研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(1): 50-54, 59.
- [6] 鲁花, 于露, 甄欢欢, 等. 人参皂苷 Rg1 通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路促进退变人腰椎间盘髓核细胞的生长及胞外基质合成[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(4): 705-710.
- [7] 刘燃, 刘海旺, 李玲, 等. 右美托咪定和地佐辛辅助超声引导腰丛联合坐骨神经阻滞对胫腓骨折手术的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(15): 3234-3237.
- [8] 张伟, 贾萌, 杨浩, 等. 地佐辛联合帕瑞昔布钠对老年腰椎骨折术后的镇痛效果[J]. 重庆医学, 2021, 50(17): 2938-2941, 2946.
- [9] 杨彦军, 关文川, 高金勇, 等. 地佐辛在老年压缩性腰椎骨折全麻手术中的预防性镇痛效果及对康复的影响[J]. 武警医学, 2020, 31(1): 47-50.
- [10] 张立民, 李睿, 孙文波, 等. 地佐辛对  $\beta$  淀粉样多肽处理的原代大鼠皮质星形胶质细胞的保护作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(2): 175-178.
- [11] ZHONG Z W, ZHOU W C, SUN X F, et al. Dezinone regulates the malignant potential and aerobic glycolysis of liver cancer targeting Akt1/GSK-3 $\beta$  pathway[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(7): 480.
- [12] WILKESMANN S, WESTHAUSER F, FELLEBERG J. Combined fluorescence-based in vitro assay for the simultaneous detection of cell viability and alkaline phosphatase activity during osteogenic differentiation of osteoblast precursor cells [J]. Methods Protoc, 2020, 3(2): 30.
- [13] KIM E J, JUNG J I, JEON Y E, et al. Aqueous extract of *Petasites japonicus* leaves promotes osteoblast differentiation via up-regulation of Runx2 and Osterix in MC3T3-E1 cells [J]. Nutr Res Pract, 2021, 15(5): 579-590.
- [14] 黄振明, 蔡卓, 钱静, 等. 微小 RNA-335-5p 调控 BMP-2 对人 BMSCs 成骨分化的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2020, 34(6): 781-786.
- [15] 赵向绒, 王海芳, 刘杨, 等. 白芍总苷对小鼠成骨细胞增殖、分化和矿化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(10): 1230-1233.
- [16] HONG W, ZHANG W J. Hesperidin promotes differentiation of alveolar osteoblasts via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2020, 40(5): 442-448.
- [17] KARAMAN I, GÜNAY A E, YERER M B, et al. Effect of kireanol on the interaction between the WNT/ $\beta$ -Catenin and RUNX2/TCF/LEF1 pathways in fracture healing *in vivo* [J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2020, 54(3): 320-329.
- [18] 马建国, 高志明, 靳雷. MiR-367 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制成骨细胞增殖的研究[J]. 实用骨科杂志, 2020, 26(1): 34-39.
- [19] SHI X L, CEN Y Z, SHAN L Y, et al. N-myc downstream regulated gene 1 suppresses osteoblast differentiation through inactivating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 53.
- [20] 平静, 何欢, 姜晨辉, 等. 格列齐特对成骨细胞 MC3T3-E1 分化及 Wnt 信号转导通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(16): 1759-1761.

(收稿日期:2022-03-14 修回日期:2022-05-16)

(上接第 938 页)

- [12] REDDIHOUGH D S, MARRAFFA C, MOUIT A, et al. Effect of fluoxetine on obsessive-compulsive behaviors in children and adolescents with autism spectrum disorders: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2019, 322(16): 1561-1569.
- [13] 赵福成, 刘彩莉, 贾奎. 柴胡舒肝散加减联合盐酸氟西汀对卒中后抑郁的影响分析[J]. 中医药信息, 2018, 35(6): 76-79.
- [14] 朱润秀, 马翔凌, 赵焱, 等. 氟哌噻吨美利曲辛联合谷维素对首发脑梗死老年患者生活质量与焦虑抑郁情绪的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2017, 20(5): 565-568.
- [15] AKTER S, UDDIN K R, SASAKI H, et al. Gamma oryzanol alleviates high-fat diet-induced anxiety-like behaviors through down-regulation of dopamine and inflammation in the amygdala of mice[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 330.
- [16] ZIĘBA A, STĘPNICKI P, MATOSIUK D, et al. Overcoming depression with 5-HT<sub>2A</sub> receptor ligands[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 10.
- [17] 张飞燕, 李晶晶, 周莹, 等. 安神类中药及其有效成分对神经递质镇静催眠机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4320-4327.
- [18] WEINBERG-WOLF H, FAGAN N A, ANDERSON G M, et al. The effects of 5-hydroxytryptophan on attention and central serotonin neurochemistry in the rhesus macaque [J]. Neuropsychopharmacology, 2018, 43(7): 1589-1598.
- [19] MENG P, LI C, DUAN S, et al. Epigenetic Mechanism of 5-HT/NE/DA Triple Reuptake Inhibitor on Adult Depression Susceptibility in Early Stress Mice[J]. Front Pharmacol, 2022, 13(1): 848251.
- [20] LATENDRESSE G, ELMORE C, DENERIS A. Selective serotonin reuptake inhibitors as first-line antidepressant therapy for perinatal depression[J]. J Midwifery Womens Health, 2017, 62(3): 317-328.
- [21] BELUJON P, GRACE A A. Dopamine system dysregulation in major depressive disorders[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2017, 20(12): 1036-1046.
- [22] MORIGUCHI S, YAMADA M, TAKANO H, et al. Norepinephrine transporter in major depressive disorder: a PET study [J]. Am J Psychiatry, 2017, 174(1): 36-41.
- [23] 黎顺成, 徐雪怡, 刘向来, 等. 野黄芩苷对卒中后抑郁模型大鼠糖原合成酶激酶 3 $\beta$ / $\beta$ -连环蛋白信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2596-2600.
- [24] KIM J M, KANG H J, KIM J W, et al. Associations of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  levels and polymorphisms with Post-Stroke depression [J]. Am J Geriatr Psychiatry, 2017, 25(12): 1300-1308.
- [25] 单瀚. 氟西汀对 IL-1 $\beta$  诱导的小鼠皮层神经元损伤的保护作用及机制[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
- [26] RAMAZANI E, AKABERI M, EMAMI S A, et al. Biological and pharmacological effects of gamma-oryzanol: an updated review of the molecular mechanisms[J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(19): 2299-2316.

(收稿日期:2022-01-06 修回日期:2022-05-11)