

[10] 中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会. 咳嗽中医诊疗专家共识意见 (2011 版) [J]. 中医杂志, 2011, 52 (10): 896-899.

[11] Jatakanon A, Lalloo U G, Lim S, et al. Increased neutrophils and cytokines, TNF- α and IL-8, in induced sputum of non-asthmatic patients with chronic dry cough[J]. *Thorax*, 1999, 54 (3): 234-237.

[12] Kwon O J, Au B T, Collins P D, et al. Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells[J]. *Immunology*, 1994, 81(3): 389-394.

[13] Koskela H O, Purokivi M K. Airway oxidative stress in chronic cough[J]. *Cough*, 2013, 9(1): 26.

[14] Yoshida T, Inoue R, Morri T, et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation[J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(11): 596-607.

[15] Rahman I, Macnee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation[J]. *Eur Respir J*, 2000, 16 (3): 534-554.

[16] Belvisi M G. Sensory nerves and airway inflammation; role of A delta and C-fibres [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2003, 16(1): 1-7.

[17] 王 越. 五味子化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.

[18] Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, et al. Gomisin N decreases inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells[J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 360-365.

[19] Cai Z Y, Liu J D, Bian H L, et al. Suppression of P2X7/NF- κ B pathways by schisandrin B contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury[J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(4): 499-507.

[20] Miao M S, Gao J L, Zhang G W, et al. Effect of *Schisandra chinensis* polysaccharide on intracerebral acetylcholinesterase and monoamine neurotransmitters in a *D*-galactose-induced aging brain mouse model [J]. *Neural Regen Res*, 2009, 4 (9): 687-693.

三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化的影响

罗劲涛¹, 王仕迎², 韦标方^{2*}
(1. 广州中医药大学, 广东 广州 511400; 2. 临沂市人民医院, 山东 临沂 276000)

摘要: **目的** 探讨三七总皂苷对激素性股骨头坏死的保护作用。**方法** 采用 CCK-8 法检测三七总皂苷 (1~1 000 mg/L) 和地塞米松 (10 μ mol/L) 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响, 偶氮偶联法检测三七总皂苷 (10、50、100 mg/L) 和地塞米松对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响, 茜素红染色法检测三七总皂苷和地塞米松对细胞矿化的影响, RT-qPCR 法和免疫荧光染色法检测三七总皂苷和地塞米松对细胞蛋白 Col-I、OCN、OPN 蛋白和 mRNA 表达的影响, Western blot 法检测三七总皂苷和地塞米松对细胞 Runx2 蛋白和 Wnt/ β -catenin 通路靶蛋白表达的影响。**结果** 10 μ mol/L 地塞米松能抑制 MC3T3-E1 细胞增殖。与正常组比较, 10~100 mg/L 三七总皂苷能促进 MC3T3-E1 细胞增殖 ($P<0.05$), 并可降低地塞米松对细胞增殖的抑制作用 ($P<0.01$)。此外, 三七总皂苷能降低地塞米松对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性和钙沉积的抑制作用 ($P<0.01$), 地塞米松可降低 MC3T3-E1 细胞 Col-I、Runx2、OCN、OPN 蛋白表达和 Wnt/ β -catenin 通路靶蛋白表达 ($P<0.05$), 三七总皂苷能升高地塞米松诱导后 MC3T3-E1 细胞 Col-I、Runx2、OCN、OPN 蛋白表达 ($P<0.05$), 而 Wnt 通路抑制剂 JW74 可阻断三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的有利作用 ($P<0.01$)。**结论** 三七总皂苷可能是通过调控 Wnt/ β -catenin 通路促进 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化从而起到治疗激素性股骨头坏死的作用。

关键词: 三七总皂苷; 激素性股骨头坏死; 地塞米松; 细胞增殖; 成骨分化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)07-2353-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.07.042

收稿日期: 2021-11-08
基金项目: 临沂市人民医院研究生培养基金 (YJS2021028)
作者简介: 罗劲涛 (1995—), 男, 硕士生, 从事中西医结合治疗股骨头坏死研究。Tel: 17332929837, E-mail: jt863031221@163.com
* 通信作者: 韦标方 (1964—), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事股骨头坏死的诊断与治疗研究。Tel: 13969900661, E-mail: weibiaofang@163.com
网络出版日期: 2022-05-25
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220524.1921.006.html>

股骨头坏死是一种进行性、顽固性和致残性疾病^[1]，目前其发病机制尚未完全阐明，酒精、类固醇使、和外伤被认为是发病的主要危险因素^[2-3]。激素性股骨头坏死是长期使用激素后发生的一种代谢紊乱，它减少了股骨头和骨细胞的血液供应，导致内部结构改变、股骨头塌陷和髋关节功能障碍^[4]。

三七总皂苷是三七活性成分之一，主要包括三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rd，具有抗血栓、抗氧化、抗炎、类雌激素样等药理作用^[5]，可促进成骨前体细胞增殖和成骨分化^[6]，通过 TGF- β 1 信号通路并升高 TGF- β 1 基因表达来促进兔骨髓间充质干细胞向成骨分化^[7]，改善去卵巢骨质疏松大鼠模型骨小梁微结构恶化^[8-9]，通过调节骨代谢来来治疗放射性骨质疏松^[10]，抑制破骨细胞活性并促进成骨，从而在大鼠股骨头坏死中发挥保护作用^[11]，但其作用机制尚不清楚。因此，本实验采用体外细胞实验探究三七总皂苷对激素性股骨头坏死保护和潜在分子机制。

1 材料

1.1 细胞 小鼠颅骨前成骨细胞亚克隆 14（MC3T3-E1 Subclone 14，批号 0095）购自美国组织培养库。

1.2 试剂与药物 三七总皂苷（纯度 $\geq 98\%$ ，批号 SS9450）购自北京索莱宝科技有限公司；地塞米松（批号 H37021969）购自辰欣药业股份有限公司；JW74（批号 GC13978）购自上海宏叶生物科技有限公司。10% 胎牛血清（批号 A31610-02）、1% 青霉素/链霉素（批号 15140122）、DMEM 高糖培养基（批号 c11995500BT）均购自美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒（批号 BB-4202-3）购自上海贝博生物科技有限公司；碱性磷酸酶（ALP）染色试剂盒（批号 G1480）、总蛋白提取试剂盒（批号 BC3710-100T）均购自北京索莱宝科技有限公司；成骨培养基（批号 MUXMT-90021）购自赛业（苏州）生物科技有限公司；ALP 活性检测试剂盒（批号 P0321M）、成骨细胞矿化结节染色试剂盒（批号 C0148S）、BCA 蛋白浓度检测试剂盒（批号 P0012）、0.5% Triton X-100（批号 P0096-100 ml）、Alexa Fluor™ 488 二抗（批号 HA1121）、DAPI（批号 P0131-5）、鬼笔环肽（批号 C2203S）均购自海门碧云天生物技术有限公司；逆转录试剂盒（批号 R712-01）、荧光定量 PCR 试剂盒（批号 R601-01）均购自北京诺贝莱生物科技有限公司；聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（批号 BS-PVDF-22）、4% 多聚甲醛（批号 BL539A）均购自北京兰杰柯生物科技有限公司；一抗 Runx2（批号 ab236639）、 β -catenin（批号 ab32572）均购自英国 Abcam 公司；一抗 GAPDH（批号 ET1601-4）、HRP 偶联二抗（批号 HA1119）均购自杭州华安生物技术有限公司；显影液（批号 WBKLS0100）购自德国 Merck 公司；一抗 Col-I（批号 A1352）、OCN（批号 A14636）均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器 多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；生物倒置显微镜、倒置荧光显微镜（日本 Nikon 公司）；高

2354

速冷冻离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；PCR 核酸扩增仪（美国 Bio-Rad 公司）；Real-Time PCR 仪（美国 ABI 公司）；化学发光成像仪（美国 Protenin Simple 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养 MC3T3-E1 细胞使用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基，置于 37 ℃、5% CO₂ 加湿恒温培养箱中培养，每 2 d 更换 1 次新的培养基。

2.2 CCK-8 法检测 MC3T3-E1 细胞增殖 采用 CCK-8 试剂盒检测三七总皂苷（1、10、50、100、200、1 000 mg/L）、地塞米松（10 μ mol/L）+ 三七总皂苷（10、50、100 mg/L）对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响。将细胞接种于 96 孔板中，每孔含 4×10^3 个细胞和 100 μ L 培养基，置于恒温培养箱中培养 24 h，更换含地塞米松或三七总皂苷的培养基，分别于 24、48、72 h 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，在 37 ℃ 下孵育 2 h，取上清液，在 450 nm 波长处检测吸光度，计算细胞增殖率，实验重复 3 次。

2.3 矿化实验 将 MC3T3-E1 细胞分别与地塞米松（10 μ mol/L）、三七总皂苷（10、50、100 mg/L）、JW74（1 μ mol/L）培养特定时间后接种于 6 孔板中，每孔含 2×10^5 个细胞和 2 mL 培养基，置于恒温培养箱中培养，待细胞达 80% 融合度后用含药成骨培养基诱导细胞向成骨分化^[12]，每 3 d 更换 1 次新的成骨培养基，在第 7 天，按照 ALP 试剂盒说明书进行染色，在显微镜下拍摄图像。在第 7、14 天，按照 ALP 活性检测试剂盒说明书在 562 nm 波长处检测 ALP 活性。在第 21 天，按照成骨细胞矿化结节染色试剂盒说明书进行钙结节染色，在显微镜下拍摄图像。

2.4 RT-qPCR 检测 MC3T3-E1 细胞中 *Col-I*、*OPN*、*OCN* mRNA 表达 MC3T3-E1 细胞采用含地塞米松（10 μ mol/L）、三七总皂苷（10、50、100 mg/L）、JW74（1 μ mol/L）成骨培养基培养 48 h 后，TRIzol-三氯甲烷提取法提取细胞总 RNA，按照试剂盒说明书进行逆转录反应，合成 cDNA，再以其为模板，*GAPDH* 为内参，按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书通过 ABI 7500 系统检测各组细胞中 *Col-I*、*OPN*、*OCN* mRNA 表达。本实验所用 PCR 引物序列均由苏州金唯智生物科技有限公司设计合成，序列见表 1。

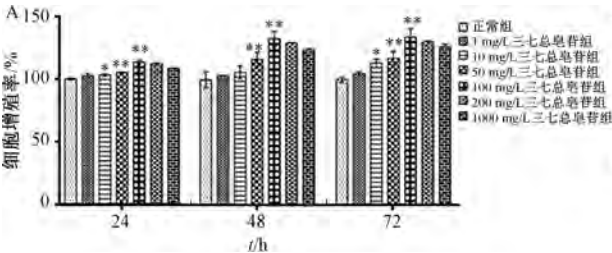
表 1 引物序列

基因	引物序列	扩增长度/bp
<i>Col-I</i>	正向 5'-CCCTGGTCCCTCTGGAAATG-3'	72
	反向 5'-GGACCTTTGCCCCCTTCTTT-3'	
<i>OCN</i>	正向 5'-TCTGACCTCACAGATGCCAAG-3'	165
	反向 5'-AGGGTTAAGCTCACACTGCT-3'	
<i>OPN</i>	正向 5'-CACATGAAGAGCGGTGACTCT-3'	95
	反向 5'-CCCTTTCGGTTGTTGTCCTG-3'	
<i>GAPDH</i>	正向 5'-TGTCTCTCGGACTTCAACA-3'	182
	反向 5'-GGTGGTCCAGGGTTTCTTACT-3'	

2.5 Western blot 法检测 MC3T3-E1 细胞中 Runx2、 β -catenin 蛋白表达 收集培养 48 h 后的 MC3T3-E1 细胞，按

照总蛋白提取试剂盒说明书裂解和提取各组细胞总蛋白，按照 BCA 蛋白浓度检测试剂盒说明书检测各组总蛋白浓度，取等量蛋白上样，15% SDS-PAGE 电泳，将蛋白转移到 PVDF 膜上，用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h，置于稀释好的一抗 Runx2、 β -catenin、GAPDH 溶液中，在 4℃ 下孵育过夜，PBST 清洗 3 次，加 HRP 偶联的二抗室温孵育 1.5 h，PBST 清洗 3 次，使用显影液，置于多功能成像仪中曝光，采用自带的软件测量条带灰度值，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白的相对表达。

2.6 免疫荧光染色检测 Col-I、OCN 蛋白表达 将 MC3T3-E1 细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中的细胞爬片上，待爬片细胞达 80% 融合度后，更换含 10 μ mol/L 地塞米松、100 mg/L 三七总皂苷的成骨培养基培养 48 h，4% 多聚甲醛固定 30 min，0.5% Triton X-100 室温通透细胞膜 20 min，正常山羊血清室温封闭 30 min，滴加足量一抗 Col-I、OCN 溶液完全覆盖爬片，在 4℃ 下孵育过夜，PBS 清洗爬片 3 次，Alexa Fluor™ 488 二抗 37℃ 避光孵育 30 min，



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与地塞米松组比较，## $P < 0.01$ 。

图 1 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

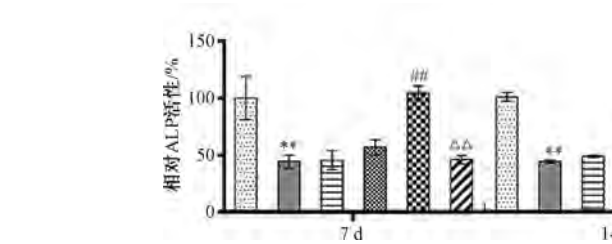
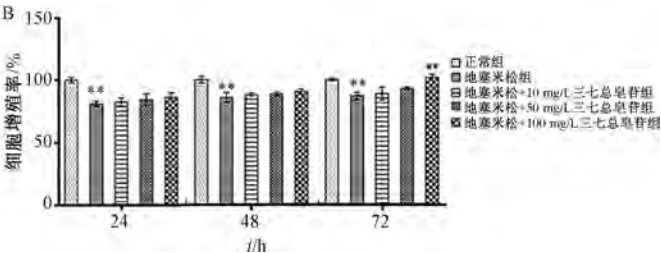
3.2 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响 与正常组比较，地塞米松组 MC3T3-E1 细胞在第 7、14 天 ALP 活性降低 ($P < 0.01$)；与地塞米松组比较，地塞米松 + 50 mg/L 三七总皂苷组 MC3T3-E1 细胞在第 14 天 ALP 活性升高 ($P < 0.01$)，地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷组 MC3T3-

DAPI 和鬼笔环肽对细胞核和骨骼进行染色，于荧光显微镜下拍摄图像。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用 t 检验或带 Tukey 校正的单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 与正常组比较，1~1 000 mg/L 三七总皂苷均能促进 MC3T3-E1 细胞增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，并且无细胞毒性作用。三七总皂苷质量浓度为 100 mg/L 时，对细胞增殖促进效果最佳 ($P < 0.01$)，见图 1A。与正常组比较，地塞米松组 MC3T3-E1 细胞在 24、48、72 h 细胞增殖率降低 ($P < 0.01$)；与地塞米松组比较，地塞米松 + 三七总皂苷 10、50、100 mg/L 组 MC3T3-E1 细胞在 24、48 h 增殖率升高，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷组 MC3T3-E1 细胞在 72 h 时细胞增殖率升高 ($P < 0.01$)，见图 1B。



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与地塞米松组比较，## $P < 0.01$ ；与地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷组比较， $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

图 2 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞中 Col-I、OCN、OPN mRNA 表达的影响 与正常组比较，地塞米松组 MC3T3-E1 细胞中 Col-I、OCN、OPN mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)；与地塞米松组比较，地塞米松 + 50 mg/L 三七总皂苷组 MC3T3-E1 细胞中 Col-I、OCN、OPN mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷组比较，地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷 + JW74 组 MC3T3-E1 细胞中 Col-I、OCN、OPN mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，见

E1 细胞在第 7、14 天 ALP 活性升高 ($P < 0.01$)；与地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷组比较，地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷 + JW74 组 MC3T3-E1 细胞在第 7、14 天 ALP 活性降低 ($P < 0.01$)，见图 2。

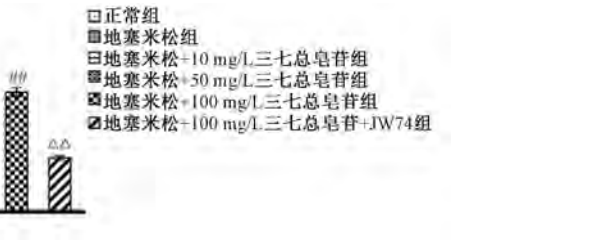
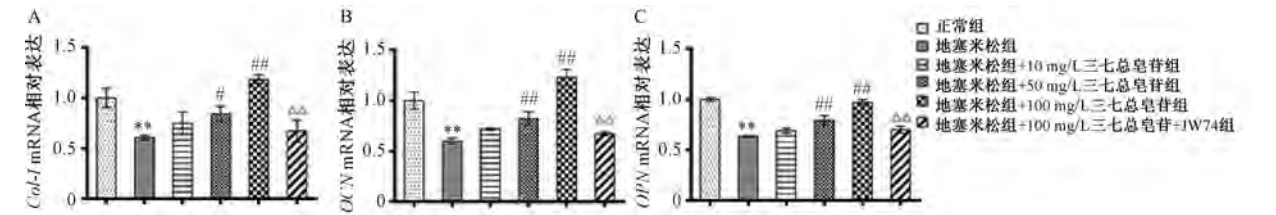


图 3。

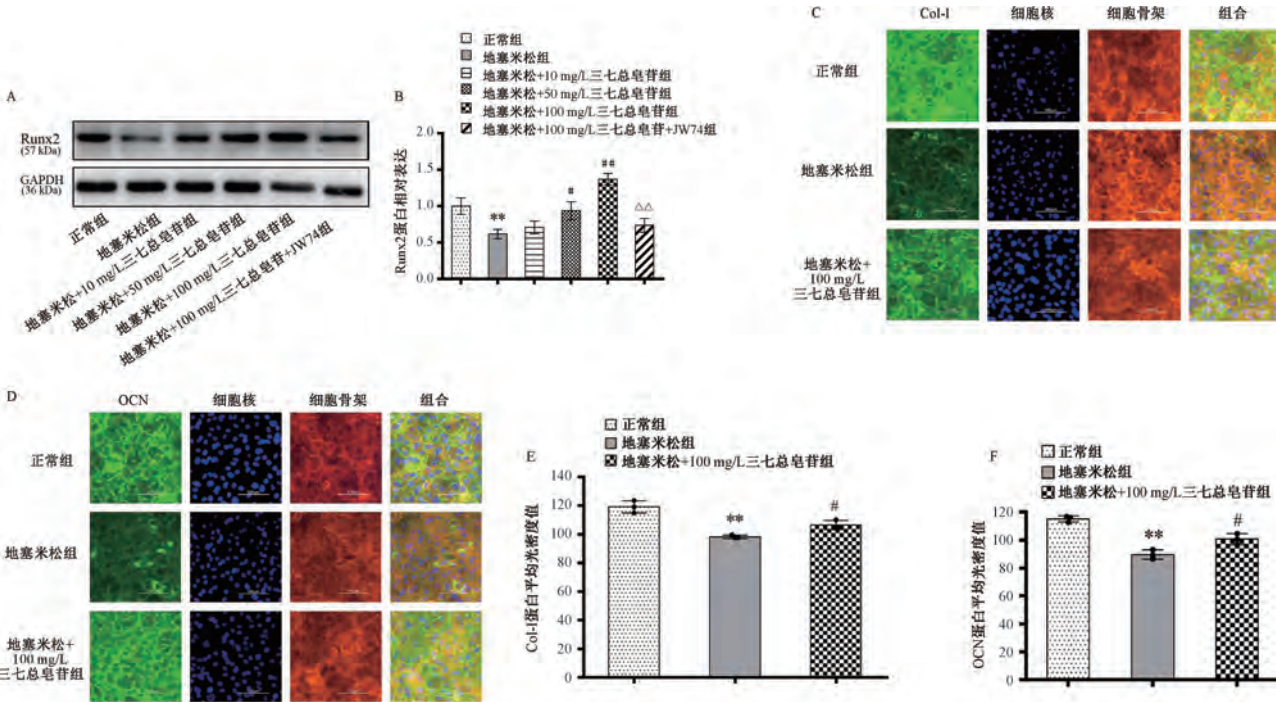
3.4 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞中 Runx2、Col-I、OCN 蛋白表达的影响 与正常组比较，地塞米松组 MC3T3-E1 细胞中 Runx2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)；与地塞米松组比较，地塞米松 + 50、100 mg/L 三七总皂苷组 MC3T3-E1 细胞中 Runx2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷组比较，地塞米松 + 100 mg/L 三七总皂苷 + JW74 组 MC3T3-E1 细胞中 Runx2 蛋白表达降低 ($P <$



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与地塞米松组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷组比较， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 3 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞中 *Col-1* (A)、*OCN* (B)、*OPN* (C) mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

0.01)，见图 4A~4B。与正常组比较，地塞米松组 MC3T3-E1 细胞中 Col-I、OCN 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与地塞米松组比较，地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷组 MC3T3-E1 细胞中 Col-I、OCN 表达升高 ($P<0.05$)，见图 4C~4F。



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与地塞米松组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷组比较， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 4 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞中 Runx2、Col-I、OCN 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.5 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞矿化作用的影响 与正常组比较，地塞米松组 MC3T3-E1 细胞 ALP 和钙结节的形成降低 ($P<0.01$)；与地塞米松组比较，地塞米松+50、100 mg/L 三七总皂苷组 MC3T3-E1 细胞 ALP 和钙结节的形成升高 ($P<0.01$)；与地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷组比较，地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷+JW74 组 MC3T3-E1 细胞 ALP 和钙结节的形成降低 ($P<0.01$)，见图 5。

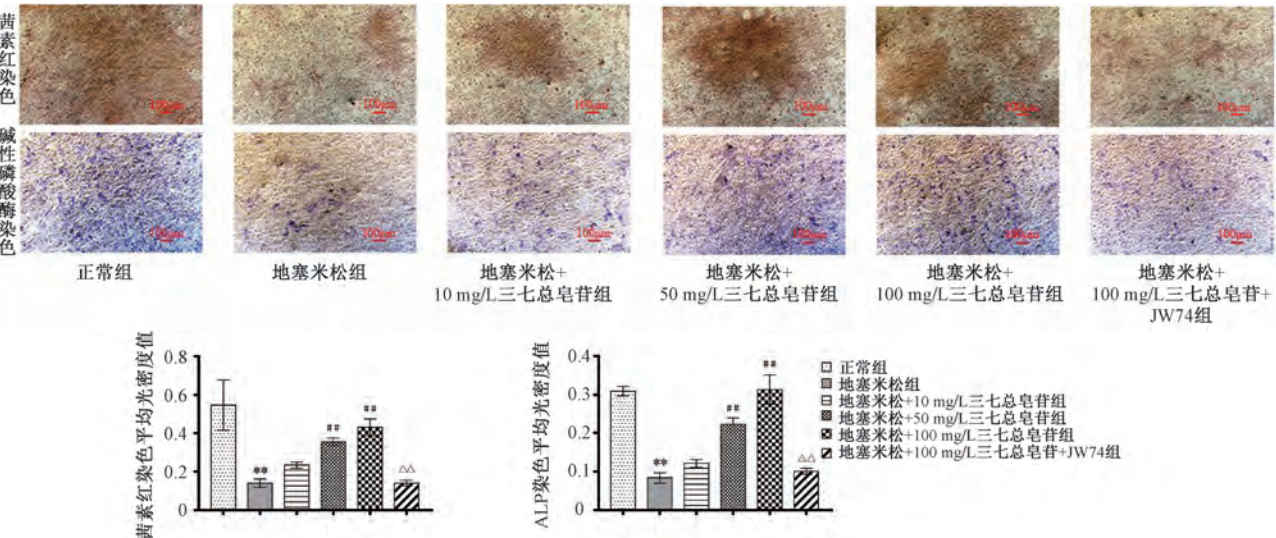
3.6 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞中 Wnt/ β -catenin 通路靶蛋白的影响 与正常组比较，地塞米松组 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与地塞米松组比较，地塞米松+各剂量三七总皂苷组 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin 蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈剂量依赖性；与地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷组比较，地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷+JW74 组 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin 表达降低 ($P<0.05$)，见图 6。

4 讨论

激素性股骨头坏死是一种过度使用糖皮质激素导致的主要临床表现为股骨头塌陷和髋关节功能障碍的进行性骨代谢疾病，其发病机制尚无统一认识^[13]。成骨细胞分化停滞和骨量减少是激素性股骨头坏死的主要机制之一^[14]。因此，促进成骨细胞增殖和成骨分化被认为是激素性股骨头坏死的有效治疗策略。

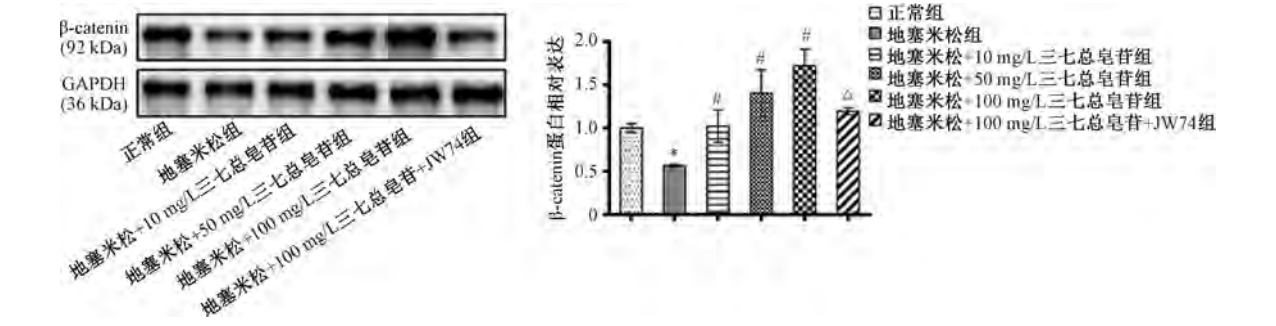
三七总皂苷在治疗股骨头坏死中展现出巨大潜力。滕居赞等^[15]研究发现，三七总皂苷能改善家兔激素性股骨头坏死模型的血液流变学，从而促进坏死区域骨生长和修复。研究发现，促进成骨细胞增殖的药物能促进骨形成^[16]。本研究结果显示，三七总皂苷能提高成骨细胞增殖活力，并能缓解地塞米松对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用。

ALP 高表达是成骨细胞分化的早期标志，其能在成骨的过程中促进矿化，钙结节形成是成骨细胞进一步分化成熟的标志。本研究结果发现，地塞米松能降低 ALP 活性，



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与地塞米松组比较，## $P<0.01$ ；与地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷组比较， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 5 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞矿化作用的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与地塞米松组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与地塞米松+100 mg/L 三七总皂苷组比较， $\Delta P<0.05$ 。

图 6 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞对 Wnt/ β -catenin 通路靶蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

抑制 ALP 和钙结节的形成，而三七总皂苷则能逆转地塞米松对 MC3T3-E1 细胞成骨分化抑制作用，从而剂量依赖性促进 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化。

Runx2 是骨形成早期特殊的标记基因，其不仅可以促进成骨细胞分化，还能促进骨细胞外基质蛋白的合成来调节成熟成骨细胞成骨。OCN 是骨基质矿化所必需的非胶原蛋白之一，是成骨细胞晚期分化的标志。Col-I 不仅在骨形成过程中为骨细胞钙盐沉积提供场所^[17]，还具有调节成骨细胞分化活性的作用^[18]。研究发现，OPN 具有促进 BMSCs 向成骨细胞分化的作用，是早期成骨的标记之一。本研究结果显示，三七总皂苷能逆转地塞米松对 MC3T3-E1 细胞 Runx2 蛋白表达的抑制作用，从而促进 Runx2 蛋白表达；此外，地塞米松能抑制 Col-I、OCN、OPN mRNA 表达，而三七总皂苷则剂量依赖性逆转地塞米松的抑制作用，促进 Col-I、OCN、OPN mRNA 表达；免疫荧光染色结果证实，三七总皂苷能逆转地塞米松对 Col-I、OCN 蛋白表达的抑制作用。由此可知，三七总皂苷是通过降低或逆转地塞米松对 Col-I、OCN、Runx2、OPN 蛋白表达的抑制作用，从而促进 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化。

Wnt/ β -catenin 信号通路被证明是调节成骨细胞分化和

骨细胞成熟的重要信号转导途径^[19]。研究发现，类固醇通过降低成骨细胞中 β -catenin 蛋白的活性调节 Wnt 信号通路而减少骨形成^[20]。本研究结果发现，在诱导 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化的早期和末期，JW74 能解除三七总皂苷逆转地塞米松降低 ALP 活性，抑制 ALP 和钙结节形成的有利作用；而且在成骨过程中，JW74 能抑制三七总皂苷对 Col-I、OCN、Runx2、OPN 表达的促进作用。此外，三七总皂苷能剂量依赖性逆转地塞米松对 β -catenin 蛋白表达的抑制作用，而 JW74 则能抑制三七总皂苷促进 β -catenin 表达的有利作用。由此可知，三七总皂苷是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化。

综上所述，三七总皂苷在体外被证实可以通过 Wnt/ β -catenin 信号通路预防激素性股骨头坏死，可能是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路刺激成骨前体细胞在体外成骨过程中的细胞增殖，提高 ALP 活性，促进 Col-I、Runx2、OCN、OPN 等成骨相关蛋白的合成和细胞矿化来促进成骨，为股骨头坏死等骨代谢异常疾病的治疗开辟了新的研究思路。

参考文献：

[1] Zhang C, Su Y, Ding H, et al. Mesenchymal stem cells-

derived and siRNAs-encapsulated exosomes inhibit osteonecrosis of the femoral head [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (17): 9605-9612.

[2] Tan B, Li W L, Zeng P, *et al.* Epidemiological study based on China osteonecrosis of the femoral head database[J]. *Orthop Surg*, 2021, 13(1): 153-160.

[3] Petek D, Hannouche D, Suva D. Osteonecrosis of the femoral head: pathophysiology and current concepts of treatment [J]. *EFORT Open Rev*, 2019, 4(3): 85-97.

[4] Chang C, Greenspan A, Gershwin M E. The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-Induced osteonecrosis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102460.

[5] 国家中医心血管病临床医学研究中心, 中国医师协会中西医结合医师分会, 中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会, 等. 三七总皂苷制剂临床应用中国专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(10): 1157-1167.

[6] Ji Z, Cheng Y Z, Yuan P W, *et al.* *Panax notoginseng* stimulates alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(9): 950-957.

[7] Wang Y, Huang X P, Tang Y Y, *et al.* Effects of *Panax notoginseng* saponins on the osteogenic differentiation of rabbit bone mesenchymal stem cells through TGF-β1 signaling pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 319.

[8] Fan J Z, Wang Y, Meng Y, *et al.* *Panax notoginseng* saponins mitigate ovariectomy-Induced bone loss and inhibit marrow adiposity in rats[J]. *Menopause*, 2015, 22(12): 1343-1350.

[9] Hu H, Chen Y, Zou Z Y, *et al.* *Panax notoginseng* saponins prevent bone loss by promoting angiogenesis in an osteoporotic mouse model[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8412468.

[10] Wen X D, Shu F D, Xiao L Y, *et al.* *Panax notoginseng* saponins suppress radiation-induced osteoporosis by regulating bone formation and resorption [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22 (9): 813-819.

[11] 方姝晨, 邹 季, 史政康, 等. 三七总皂苷对股骨头坏死大鼠股骨头成骨作用影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(6): 6-9; 15.

[12] Li M, Jia W B, Zhang X L, *et al.* Hyaluronic acid oligosaccharides modified mineralized collagen and chitosan with enhanced osteoinductive properties for bone tissue engineering [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 260: 117780.

[13] Wang A, Ren M, Wang J C. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: a systematic review of the literature[J]. *Gene*, 2018, 671: 103-109.

[14] Lebouvier A, Poignard A, Cavet M, *et al.* Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 68.

[15] 滕居赞, 林宝举, 苏 波, 等. 三七总皂苷对激素性股骨头坏死家兔血液流变学影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(7): 31-33.

[16] Letarouilly Y J G, Broux O, Clabau A. New insights into the epigenetics of osteoporosis [J]. *Genomics*, 2019, 111 (4): 793-798.

[17] Garner P. The role of collagen organization on the properties of bone[J]. *Calcif Tissue Int*, 2015, 97(3): 229-240.

[18] Bala Y, Seeman E. Bone ’ s material constituents and their contribution to bone strength in health, disease, and treatment [J]. *Calcif Tissue Int*, 2015, 97(3): 308-326.

[19] Baron R, Gori F. Targeting WNT signaling in the treatment of osteoporosis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 40: 134-141.

[20] Jullien N, Maudinet A, Leloutre B, *et al.* Downregulation of ErbB3 by Wnt3a contributes to wnt-Induced osteoblast differentiation in mesenchymal cells [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(6): 2047-2056.