

杜仲中松脂素二葡萄糖苷和松脂素对成骨细胞中 OPG 和 RANKL 表达的影响

胡倩影, 尹瑞林, 王一飞, 刘雪晴, 丁艳霞*

(河南大学 河南省杜仲栽培与利用工程实验室, 中药研究所, 河南 开封 475004)

[摘要] **目的:**观察杜仲中松脂素二葡萄糖苷及其苷元松脂素对体外培养的小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 的影响。**方法:**采用质量浓度为 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷与松脂素体外干预 MC3T3-E1 成骨细胞 48, 72 h, 采用噻唑蓝法检测细胞增殖情况, 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒检测细胞分化情况, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞骨保护素 (OPG) 与核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白表达的水平。**结果:**与空白组相比, 培养 48 h, $1 \times 10^{-4} \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 松脂素二葡萄糖苷及 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 松脂素均能促进成骨细胞增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 培养 72 h, $1 \times 10^{-3} \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 松脂素二葡萄糖苷及 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 松脂素能促进成骨细胞增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白组相比, 培养 48 h 时, 质量浓度为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷、松脂素均能够显著促进成骨细胞 ALP 分泌 ($P < 0.01$); 培养 72 h 时, 质量浓度为 $0.1 \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷和 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 松脂素均能显著促进成骨细胞 ALP 分泌 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白组相比, 培养 48 h, $1 \times 10^{-5} \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷和松脂素均能促进 OPG 蛋白分泌 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 只有松脂素在 1×10^{-5} , $1 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能明显抑制 RANKL 蛋白的分泌 ($P < 0.01$), 在 $1 \times 10^{-5} \sim 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时提高 OPG/RANKL ($P < 0.01$)。**结论:**松脂素二葡萄糖苷与松脂素均能通过促进成骨细胞的增殖和分化达到抗骨质疏松作用, 但其作用机制不同, 松脂素二葡萄糖苷主要通过促进 OPG 分泌来发挥, 而松脂素则既能通过促进 OPG 分泌又能通过抑制 RANKL 表达来发挥作用。

[关键词] 杜仲; 松脂素二葡萄糖苷; 松脂素; 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞; 增殖分化; 骨保护素; 核转录因子- κ B 受体活化因子配体

[中图分类号] R24; R289; R285.5; R284; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0181-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180908

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.1523.015.html>

[网络出版时间] 2018-02-14 20:21

Effect of Pinoresinol Diglucoside and Pinoresinol from Eucommiae Cortex on Expression of OPG and RANKL in Osteoblasts

HU Qian-ying, YIN Rui-lin, WANG Yi-fei, LIU Xue-jing, DING Yan-xia*

(Henan Engineering Laboratory of Cultivation and Utilization of Eucommiae Cortex, Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of pinoresinol diglucoside (PDG) and pinoresinol from Eucommiae Cortex on osteoblastic-like cell-line of MC3T3-E1. **Method:** MC3T3-E1 osteoblasts were cultured with $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of PDG and pinoresinol for 48, 72 h, respectively. The proliferation of cell was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, the differentiation of osteoblasts was detected by alkaline phosphatase (ALP) kit, the protein expression of osteoprogenin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) were examined by Western blot and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared

[收稿日期] 20170831(009)

[基金项目] 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-HEN-19); 河南大学博士科研启动项目 (2016025)

[第一作者] 胡倩影, 在读硕士, 从事细胞分子生物学研究, E-mail: 1790525012@qq.com

[通信作者] * 丁艳霞, 博士, 实验师, 从事中药化学及药理学研究, E-mail: dingyanxia@henu.edu.cn

to the control group, when cultivating 48 h, 1×10^{-4} -100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of PDG and 1×10^{-4} -1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of pinosresinol stimulated the proliferation of cell ($P < 0.05$, $P < 0.01$); at 72 h treatment time point, 1×10^{-3} -100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of PDG and 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of pinosresinol stimulated the proliferation of cell ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared to the control group, at 48 h treatment time point, 1×10^{-4} - 1×10^3 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of PDG and pinosresinol significantly promoted the secretion of ALP in osteoblasts ($P < 0.01$); at 72 h treatment time point, 0.1- 1×10^3 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of PDG and 1×10^{-4} - 1×10^3 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of pinosresinol significantly promoted the secretion of ALP in osteoblasts ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared to the control group, at 48 h treatment time point, 1×10^{-5} -10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of PDG and pinosresinol promoted the secretion of OPG ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 1×10^{-5} , 1×10^{-3} $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of pinosresinol inhibited the secretion of RANKL ($P < 0.01$) and 1×10^{-5} -0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of pinosresinol raised the OPG/RANKL ratio ($P < 0.01$). **Conclusion:** PDG and pinosresinol can promote anti-osteoporosis by promoting the proliferation and differentiation of osteoblasts, but their mechanisms of action are different. PDG mainly through the promotion of OPG secretion, but pinosresinol can play a role not only by promoting the secretion of OPG but also inhibiting the expression of RANKL.

[Key words] Eucommiae Cortex; pinosresinol diglucoside; pinosresinol; precursor cells of mouse embryonic osteoblasts; proliferation and differentiation; osteoprogenin; receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

杜仲是杜仲科植物杜仲的干燥树皮,具有补肝肾、强筋骨、安胎之功效^[1]。现代药理研究表明杜仲具有增加骨密度、改善骨小梁微体结构、抑制骨量减少和骨强度下降等作用,因此,杜仲是很多治疗骨质疏松方剂的常用药^[2]。

中医理论认为“肾藏精,主骨生髓”。肾气的盛衰决定着骨的强健和衰弱,因此,补肾中药大多能有效降低骨质疏松大鼠的骨代谢异常旺盛水平,提高其骨密度。中药炮制理论认为,盐咸寒入肾,补肾中药盐炙后其补肾作用增强,因此临床常采用盐炙品^[3]。有研究表明杜仲经过盐水制后,能引药入肾,增强其抗骨质疏松作用^[4]。松脂素二葡萄糖苷是杜仲抗骨质疏松作用的主要有效成分之一^[5],但是杜仲盐炙后松脂素二葡萄糖苷的含量却明显下降^[6],这与杜仲盐炙后抗骨质疏松作用增强的理论不一致。本课题组前期研究也表明杜仲盐炙后松脂素二葡萄糖苷质量分数下降 40%~60%,对应的苷元松脂素的质量分数则上升了 40%~60%^[7]。这些研究结果进一步提示松脂素可能同样具有抗骨质疏松作用,且作用效果可能优于松脂素二葡萄糖苷,但到目前为止,关于松脂素抗骨质疏松作用的研究很少。本实验拟采用体外培养的 MC3T3-E1 成骨细胞比较松脂素二葡萄糖苷和松脂素在体外抗骨质疏松作用的差异,为解析杜仲的“盐炙入肾”理论提供参考。

1 材料

SW-CJ-1D 型超净台(苏州净化设备有限公司), Labserv CO-150 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo

Fisher Scientific 公司), CKX31-A12PHP 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), DNM-9602G 型酶标仪(北京普朗新技术有限公司), DYY-6 型电泳仪(北京六一仪器厂), AlphaEaseFC 灰度分析软件(Alpha Innotech 公司)。

小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1(中国医学科学院基础医学研究所), 松脂素二葡萄糖苷和松脂素对照品(上海西宝生物科技有限公司,批号分别为 63902-38-5, 69251-96-3, 纯度均 $\geq 98\%$), α -MEM 干粉培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 03630, 1704206), 胰蛋白酶(美国 HyClone 公司,批号 C0201), 碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20161103), 小鼠骨保护素(OPG)试剂盒和核转录因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为 85-BMS82021FF, 85-EPX010-26037-901), 二甲基亚砜(天津市化学试剂一厂), 青链霉素(北京索莱宝科技有限公司,批号 20170322); β -肌动蛋白(β -actin), RIPA 裂解液, 苯甲基磺酰氟(PMSF, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒, 增强化学发光剂(ECL), 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl 缓冲盐溶液(TBS 缓冲液)均购自武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为 GB13001-1, G2002, G2008, G2026, G2014, G0001。

2 方法

2.1 溶液的配制 取 NaCl 4 g, Na₂HPO₄·12H₂O 1.45 g, KCl 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g 和水 500 mL, 混匀,

高压灭菌,即得磷酸盐缓冲液(PBS),4℃保存。取胎牛血清(FBS)9 mL,青链霉素1 mL, α -MEM培养基90 mL,混匀,即得细胞培养液,4℃保存。

2.2 松脂素二葡萄糖苷、松脂素药液的制备 精确称量松脂素二葡萄糖苷、松脂素对照品各2.0 mg,分别超声使溶解于2 mL的1%二甲基亚砷(DMSO)中,经0.22 μ m 无菌微孔滤膜过滤除菌后,得 $1 \times 10^6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮存液。临用前需要将贮存液用不含血清的细胞培养液(青链霉素1 mL, α -MEM培养基99 mL)稀释成质量浓度分别为 1×10^3 ,100,10,1,0.1, 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-7} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液用于细胞加药。

2.3 MC3T3-E1细胞的培养及传代 将MC3T3-E1细胞培养于37℃,5% CO₂饱和湿度的环境中。当细胞培养至90%贴壁时,弃去旧培养液。加入PBS 3 mL,轻轻摇动培养瓶,使缓冲液流过所有细胞表面,倒掉缓冲液,加入0.25%胰蛋白酶1 mL。显微镜下随时观察消化情况。当细胞质回缩、细胞间隙增大或有细胞悬浮时,加入含血清的培养液2 mL,终止消化。用吹打管吸取瓶内的培养液,反复轻柔吹打瓶壁,使细胞脱离瓶壁并悬浮于培养液中,移至离心管(每管装液不超过6 mL),于1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去上清液,用含血清的培养液2 mL重新悬浮细胞(多个离心管合并),计数。分别接种在培养瓶中,每2 d更换1次培养基。

2.4 噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖活性 取对数生长期的细胞以0.25%胰蛋白酶消化,调整其密度至 5×10^4 个/mL接种于96孔板,每100 μ L,设置4个复孔。接种于板孔内的细胞随机分为空白组、药物组。待细胞完全贴壁后,弃去孔中培养基,药物组更换为含药培养基,空白组则加入不含药培养基,每孔200 μ L。松脂素、松脂素二葡萄糖苷加药的质量浓度分别为 1×10^3 ,100,10,1,0.1, 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-7} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别培养48,72 h后取出,培养液每100 μ L中加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 10 μ L,37℃避光孵育4 h后弃去上清液,每孔加入DMSO 150 μ L,置于恒温培养振荡器内振荡10 min,使结晶充分溶解,于570 nm处检测各孔的吸光度A。

2.5 细胞中碱性磷酸酶(ALP)的活性检测 取对数生长期的细胞以0.25%胰蛋白酶消化,调整其密度至 5×10^4 个/mL接种于96孔板,每孔100 μ L,设置4个复孔。接种于板孔内的细胞随机分为空白组、药物组。待细胞完全贴壁后,弃去孔中培养基,

药物组更换为含药培养基,空白组则加入不含药培养基,每孔200 μ L。松脂素二葡萄糖苷、松脂素的加药质量浓度分别为1 000,100,10,1,0.1, 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别培养48,72 h后取出,收集细胞上清液,于1 000 r·min⁻¹离心20 min,除去杂质以及细胞碎片,取上清液,按照碱性磷酸酶试剂盒(微量酶标法)说明书严格操作,于520 nm下测定每孔A,采用ALP活性率评价细胞ALP活性。

2.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清OPG,RANKL蛋白含量 取对数生长期的细胞以0.25%胰蛋白酶消化,调整其密度至 5×10^4 个/mL接种于96孔板,每孔100 μ L,设置4复孔,将细胞随机分为空白组及药物组。待细胞完全贴壁后,弃去孔中培养基,药物组更换为含药培养基,空白组则加入不含药培养基,每孔200 μ L。松脂素、松脂素二葡萄糖苷加药终质量浓度均为10,0.1, 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养48,72 h后取出,收集细胞培养上清液,于1 000 r·min⁻¹离心20 min,除去杂质及细胞碎片,取上清液备用。严格按照小鼠OPG和RANKL试剂盒使用说明书操作,检测OPG和RANKL蛋白含量。

2.7 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测细胞OPG和RANKL蛋白表达 取对数生长期的细胞以0.25%胰蛋白酶消化,调整其密度至 5×10^4 个/mL接种于96孔板中,每孔2 mL,接种于板孔内的细胞随机分为空白组、药物组。待细胞完全贴壁后,弃去孔板中培养基,药物组更换为含药培养基,空白组则加入不含药培养基,各4 mL。调整松脂素二葡萄糖苷、松脂素加药终质量浓度分别为10,0.1, 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养48 h后取出,加入适量预冷PBS,轻轻摇动培养瓶,使缓冲液流过所有细胞表面,弃去液体,重复2~3次,最后1次彻底吸干残留液。加入适量RIPA裂解液(使用前数分钟内加入PMSF 0.01 mL)于培养瓶内3~5 min,期间反复晃动培养瓶,使试剂与细胞充分接触。用细胞刮刀将细胞及试剂刮下,收集到1.5 mL离心管中,冰浴30 min,期间用移液器反复吹打,确保细胞完全裂解。于12 000 r·min⁻¹离心5 min,收集上清,即为总蛋白溶液。按BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书测定各组总蛋白含量。加入6 \times 上样缓冲液(loading buffer),保证各组总蛋白的质量浓度 $>1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,沸水中煮8 min,-2℃保存备用。将转好的膜于室温下脱色摇床上用5%脱脂牛奶,封闭1 h。稀释一

抗, 4 ℃ 孵育过夜(快转)。用 TBS 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min。将二抗用 TBST 稀释 3 000 倍, 室温下孵育 30 min, 用 TBS 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min。将 2 种酶促化学发光分析试剂(ECLA 和 ECLB)在离心管中等体积混合, 将聚偏氟乙烯(PVDF)膜的蛋白面朝上与此混合液充分接触, 1~2 min 后去尽残液, 包好, 放入暗匣中曝光。最后用显影、定影试剂进行显影和定影。以 β -actin 为内参蛋白, 定量计算每个蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析 所有实验均重复 2 次, 采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *T* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖的影响 见表 1。结果与空白组相比, 培养 48 h 时, 质量浓度为 $1 \times 10^{-4} \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷及 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素均能促进成骨细胞的增殖 ($P < 0.05, P < 0.01$); 培养 72 h 时, 质量浓度为 $1 \times 10^{-3} \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷和 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素均能够显著促进成骨细胞增殖 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

3.2 对 MC3T3-E1 成骨细胞 ALP 分泌的影响 由表 2 可知, 与空白组相比, 培养 48 h 时, 质量浓度为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷、松脂素均能够促进成骨细胞 ALP 分泌 ($P < 0.01$); 培养 72 h 时, 质量浓度为 $0.1 \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷和 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素均能显著促进成骨细胞 ALP 分泌 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

3.3 对 MC3T3-E1 成骨细胞中 OPG 和 RANKL 蛋白分泌的影响 由表 3 可知, 与空白组相比, 培养 48 h 时, 质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷均能显著促进成骨细胞 OPG 的分泌 ($P < 0.05, P < 0.01$); 72 h 时, $1 \times 10^{-5} \sim 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 松脂素二葡萄糖苷能显著促进成骨细胞 OPG 的分泌 ($P < 0.05$), 但松脂素仅质量浓度为 $0.1, 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能显著促进成骨细胞 OPG 的分泌 ($P < 0.01$)。与空白组相比, 培养 48, 72 h 时, 处于 $1 \times 10^{-5} \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 松脂素二葡萄糖苷均能促进成骨细胞 RANKL 的分泌; 质量浓度为 $1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素能显著抑制成骨细胞 RANKL 的分泌 ($P < 0.01$)。

3.4 对 MC3T3-E1 成骨细胞中 OPG 和 RANKL 蛋

表 1 松脂素二葡萄糖苷、松脂素对 MC3T3-E1 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of pinoresinol diglucoside and pinoresinol on proliferation of MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

t/h	组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖/%
48	空白	-	100.00 \pm 1.02
		1×10^{-7}	93.19 \pm 1.04
		1×10^{-6}	101.64 \pm 0.49
		1×10^{-5}	105.99 \pm 0.74
		1×10^{-4}	107.98 \pm 0.68 ¹⁾
		1×10^{-3}	117.18 \pm 0.67 ²⁾
		1×10^{-2}	106.07 \pm 0.54 ¹⁾
		0.1	107.65 \pm 0.68 ¹⁾
		1	106.90 \pm 0.64 ¹⁾
	松脂素	10	113.88 \pm 0.64 ²⁾
		100	112.14 \pm 0.51 ²⁾
		1×10^3	94.89 \pm 0.87
		1×10^{-7}	93.61 \pm 0.52
		1×10^{-6}	101.85 \pm 0.79
		1×10^{-5}	102.96 \pm 1.20
		1×10^{-4}	109.00 \pm 1.57 ¹⁾
		1×10^{-3}	115.50 \pm 1.65 ²⁾
		1×10^{-2}	123.95 \pm 1.27 ²⁾
		0.1	107.16 \pm 1.62 ¹⁾
72	空白	-	100.00 \pm 1.02
		1×10^{-7}	98.51 \pm 1.05
		1×10^{-6}	97.42 \pm 1.34
		1×10^{-5}	102.39 \pm 0.98
		1×10^{-4}	104.46 \pm 1.34
		1×10^{-3}	121.47 \pm 1.28 ²⁾
		1×10^{-2}	135.73 \pm 1.41 ²⁾
		0.1	133.82 \pm 1.37 ²⁾
		1	119.93 \pm 1.17 ²⁾
	松脂素	10	121.21 \pm 1.13 ²⁾
		100	109.96 \pm 0.95 ¹⁾
		1×10^3	102.14 \pm 1.05
		1×10^{-7}	92.70 \pm 1.34
		1×10^{-6}	100.64 \pm 1.12
		1×10^{-5}	99.81 \pm 0.83
		1×10^{-4}	103.19 \pm 0.86
		1×10^{-3}	99.23 \pm 1.02
		1×10^{-2}	97.45 \pm 1.27
		0.1	117.36 \pm 1.34 ²⁾
松脂素	1	104.13 \pm 1.09	
	10	102.50 \pm 1.05	
	100	102.94 \pm 1.07	
	1×10^3	90.25 \pm 1.03	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 松脂素二葡萄糖苷、松脂素对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of pinoresinol diglucoside and pinoresinol on differentiation of MC3T3-E1 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

t/h	组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ALP 活性/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	
48	空白	-	2.08 ± 0.21	
	松脂素二葡萄糖苷	1×10^{-4}	2.83 ± 0.14 ²⁾	
		1×10^{-3}	2.93 ± 0.32 ²⁾	
		1×10^{-2}	2.97 ± 0.28 ²⁾	
		0.1	2.86 ± 0.24 ²⁾	
		1	2.96 ± 0.16 ²⁾	
		10	2.92 ± 0.18 ²⁾	
		100	3.04 ± 0.20 ²⁾	
	松脂素	1×10^3	3.09 ± 0.17 ²⁾	
		1×10^{-4}	2.65 ± 0.16 ²⁾	
		1×10^{-3}	2.75 ± 0.18 ²⁾	
		1×10^{-2}	2.73 ± 0.11 ²⁾	
		0.1	2.69 ± 0.22 ²⁾	
		1	2.79 ± 0.27 ²⁾	
		10	2.85 ± 0.26 ²⁾	
	72	空白	-	2.56 ± 0.21
		松脂素二葡萄糖苷	1×10^{-4}	2.53 ± 0.25
			1×10^{-3}	2.54 ± 0.13
1×10^{-2}			2.68 ± 0.18	
0.1			3.01 ± 0.16 ²⁾	
1			3.02 ± 0.19 ²⁾	
10			3.05 ± 0.24 ²⁾	
100			2.90 ± 0.21 ¹⁾	
松脂素		1×10^3	3.09 ± 0.16 ²⁾	
		1×10^{-4}	2.84 ± 0.22 ¹⁾	
		1×10^{-3}	2.86 ± 0.30 ¹⁾	
		1×10^{-2}	2.89 ± 0.31 ¹⁾	
		0.1	2.90 ± 0.37 ¹⁾	
		1	2.92 ± 0.21 ¹⁾	
		10	3.04 ± 0.15 ²⁾	
100		3.07 ± 0.26 ²⁾		
		1×10^3	3.02 ± 0.24 ²⁾	

白表达的影响 由表 4 可知,与空白组相比,培养 48 h 时,质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷及松脂素均能显著促进成骨细胞中 OPG 蛋白的表达($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组相比,质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的松脂素二葡萄糖苷对成骨细胞中 RANKL 蛋白的表达具有促进作用,而 $1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 松脂素能显著抑

表 3 松脂素二葡萄糖苷、松脂素对 MC3T3-E1 成骨细胞中 OPG 和 RANKL 蛋白分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of pinoresinol diglucoside and pinoresinol on protein secretion level of OPG and RANKL in MC3T3-E1 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

t/h	组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	OPG/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	RANKL/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
48	空白	-	3 427.86 ± 2.07	3 743.77 ± 2.14	
	松脂素二葡萄糖苷	1×10^{-5}	3 836.44 ± 1.28 ¹⁾	8 571.47 ± 1.26	
		1×10^{-3}	4 456.31 ± 1.87 ²⁾	5 090.48 ± 2.17	
	松脂素	0.1	3 933.27 ± 1.67 ²⁾	4 717.16 ± 1.56	
		10	3 621.89 ± 1.85 ¹⁾	4 716.18 ± 1.68	
		1×10^{-5}	4 896.27 ± 1.98 ²⁾	1 347.76 ± 2.07 ²⁾	
	72	松脂素二葡萄糖苷	1×10^{-3}	8 142.26 ± 1.69 ²⁾	2 321.13 ± 3.18 ²⁾
			0.1	6 584.64 ± 1.65 ²⁾	4 529.03 ± 2.68
		松脂素	10	5 530.59 ± 1.85 ²⁾	6 064.91 ± 1.24
			-	7 306.83 ± 1.56	533.85 ± 2.15
72		松脂素二葡萄糖苷	1×10^{-5}	7 835.77 ± 1.06 ¹⁾	1 065.94 ± 2.14
			1×10^{-3}	7 828.20 ± 1.07 ¹⁾	619.25 ± 1.87
		松脂素	0.1	7 672.18 ± 2.04 ¹⁾	891.51 ± 1.32
	10		7 319.00 ± 1.68	752.71 ± 1.28	
	松脂素	1×10^{-5}	6 737.73 ± 1.95	128.12 ± 1.69 ²⁾	
		1×10^{-3}	7 497.58 ± 2.07	330.98 ± 2.47 ²⁾	
		0.1	11 006.50 ± 1.36 ²⁾	619.25 ± 2.05	
	10	9 457.64 ± 1.04 ²⁾	976.93 ± 1.06		

制成骨细胞 RANKL 蛋白的表达($P < 0.01$)。与空白组相比,质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \sim 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的松脂素能明显提高 OPG/RANKL($P < 0.01$)。

表 4 松脂素二葡萄糖苷、松脂素对 MC3T3-E1 成骨细胞中 OPG 和 RANKL 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of pinoresinol diglucoside and pinoresinol on protein expression level of OPG and RANKL in MC3T3-E1 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	OPG/ β -actin	RANKL/ β -actin	OPG/RANKL
空白	-	0.34 ± 0.13	0.53 ± 0.21	0.64 ± 0.17
松脂素二葡萄糖苷	1×10^{-5}	0.45 ± 0.11 ²⁾	1.27 ± 0.15	0.35 ± 0.17
	1×10^{-3}	0.38 ± 0.21 ¹⁾	0.62 ± 0.22	0.62 ± 0.16
松脂素	0.1	0.39 ± 0.17 ¹⁾	0.82 ± 0.23	0.48 ± 0.16
	10	0.36 ± 0.21 ¹⁾	0.75 ± 0.16	0.48 ± 0.13
	1×10^{-5}	0.49 ± 0.22 ²⁾	0.15 ± 0.18 ²⁾	3.26 ± 0.19 ²⁾
松脂素	1×10^{-3}	0.81 ± 0.19 ²⁾	0.35 ± 0.16 ²⁾	2.31 ± 0.25 ²⁾
	0.1	0.66 ± 0.18 ²⁾	0.62 ± 0.27	1.06 ± 0.24 ²⁾
	10	0.55 ± 0.24 ²⁾	1.03 ± 0.25	0.54 ± 0.12

4 讨论

成骨细胞来源于骨髓间充质干细胞,是骨形成过程中的关键细胞,所以成骨细胞的数量对于成骨细胞和破骨细胞之间的动态平衡非常重要,也是改善骨质疏松的一个重要指标^[8]。ALP 是成骨细胞

分化的早期标志物之一,反映骨形成的状况,其表达随着细胞分化的成熟而增强。药物可以增强成骨细胞的 ALP 活性,说明其具有促进骨形成的作用^[9]。成骨样细胞系 MC3T3-E1 属于成骨细胞前体细胞系,具备体外培养成骨细胞的各种特性^[10],本研究通过检测药物对 MC3T3-E1 细胞的增殖和 ALP 活性的影响,探讨松脂素二葡萄糖苷及其苷元松脂素的成骨作用。结果表明 48 h 时,松脂素二葡萄糖苷和松脂素既能促细胞增殖又能促细胞分化。但是 72 h 时,松脂素对细胞增殖作用不明显,说明此时松脂素主要是促进成骨细胞分化。

OPG/RANK/RANKL 系统在骨重建中起着重要作用,骨重建的过程非常复杂,涉及到各种细胞因子、激素及信号通路的调控^[11]。成骨细胞既能够产生 OPG 又能够生成 RANKL,而 RANK 则位于破骨细胞的细胞膜上,是 RANKL 的受体,RANK 与 RANKL 结合后通过肿瘤坏死因子(TNF)家族受体相关活化因子来使破骨细胞激活并分化,而 OPG 作为假受体也能够与 RANKL 进行结合,这样就会抑制 RANKL 对泛素连接酶 TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)的激活作用,从而抑制破骨细胞的激活和分化,使得破骨细胞数量减少,骨吸收也减少^[12-14]。研究表明杜仲木脂素类成分是其抗骨质疏松的主要成分,其作用机制可能是通过 OPG/RANKL 系统减少骨吸收,促进骨形成^[15]。本研究的 Western blot 和 ELISA 结果显示,松脂素二葡萄糖苷质量浓度在 $1 \times 10^{-5} \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,既能够促进 OPG 分泌,也能促进 RANKL 分泌,但对 RANKL 的促进作用要强于对 OPG 的促进作用,因而下调 OPG/RANKL,促进破骨细胞的活化。质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \sim 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的松脂素能上调 OPG/RANKL,其中质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,主要是通过抑制 RANKL 来实现,而质量浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,则主要是通过促进 OPG 分泌实现的,因此,松脂素抗骨质疏松作用主要是通过促进成骨细胞分泌 OPG,抑制 RANKL 表达,从而抑制破骨细胞活化,达到抗骨质疏松作用。松脂素二葡萄糖苷及松脂素对成骨细胞分泌 OPG 和 RANKL 的蛋白存在明显差异,但是对于造成该差异的 MC3T3-E1 细胞内的信号转导通路尚未涉及。后续将会采用 Western blot 对细胞通路的蛋白磷酸化水平进行测定,以证明该通路是否参与了对成骨细胞的作用。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:165.
- [2] ZHANG N D, HAN T, HUANG B K, et al. Traditional Chinese medicine formulas for the treatment of osteoporosis: implication for antiosteoporotic drug discovery[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189: 61-80.
- [3] 明·陈嘉谟. 本草蒙筌[M]. 北京:人民卫生出版社, 1988:5.
- [4] 狄留庆,倪美华,刘圣金,等. 杜仲炮制的历史沿革与现代研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(6): 406-408.
- [5] 刘钊. 松脂素二葡萄糖苷对 MC3T3-E1 成骨细胞 OPG 以及 RANKL 表达的影响[D]. 天津:天津医科大学, 2014.
- [6] 曹宇. 杜仲盐炙的化学成分和质量研究[D]. 大连:辽宁中医药大学, 2009.
- [7] 田己鑫. 杜仲炮制原理及杜仲雄花速溶茶的研制[D]. 开封:河南大学, 2016.
- [8] 张兴凯,杨杨铭,邓廉夫,等. 骨质疏松症成骨细胞生物学特征的体外研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(1): 48-51.
- [9] Kashiwada Y, Nagao T, Hashimoto A, et al. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives[J]. J Nat Prod, 2000, 63(12): 1619-1622.
- [10] Sudo H, Kodama H A, Amagai Y, et al. *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria[J]. J Cell Biol, 1983, 96(1): 191-198.
- [11] Wright H L, McCarthy H S, Middleton J, et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease[J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2009, 2(1): 56-64.
- [12] Ciacli C, Puşchita M. RANKL/RANK/OPG molecular complex-control factors in bone remodeling in psoriatic arthritis[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2011, 115(2): 354-360.
- [13] Lee S J, Nam K I, JIN H M, et al. Bone destruction by receptor activator of nuclear factor κ B ligand-expressing T cells in chronic gouty arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(5): R164.
- [14] 罗成燕,王凌,李大金. RANKL-RANK-OPG 环路在骨免疫网络中的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(4): 381-384.
- [15] ZHANG R, PAN Y L, HU S J, et al. Effects of total lignans from *Eucommia ulmoides* barks prevent bone loss *in vivo* and *in vitro* [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(1): 104-112.

[责任编辑 刘德文]