

两种杜仲黄酮类化合物对成骨细胞 OPG/RANKL 及成骨相关转录因子的影响

兰波¹, 刘亭¹, 谢玉敏¹, 王爱民², 李勇军^{1*}

(1. 贵阳医学院 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;
2. 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**研究杜仲黄酮类化合物紫云英苷和黄芩素对成骨细胞特异性转录因子 Osterix 及破骨细胞抑制因子与核因子 κ B 受体活化因子配体比值 (OPG/RANKL) 的影响。**方法:**采用 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞, 不同浓度紫云英苷和黄芩素和维生素 D₃ 组加入质量浓度为 30 mg·L⁻¹ 作用细胞 24 h 后, 用 MTT 法检测细胞增殖情况, 成骨细胞接种于 24 孔板后, 空白组加入培养基, 给药组分别加入质量浓度为 80 mg·L⁻¹ (高浓度), 40 mg·L⁻¹ (中浓度), 7.5 mg·L⁻¹ (低浓度) 的含紫云英苷或黄芩素, 作用 24 h 后, ELISA 法检测钙离子活性, 蛋白免疫印迹法检测 Osterix, OPG 以及 RANKL 的蛋白表达水平。**结果:**与空白组相比, 紫云英苷和黄芩素可后明显促进 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的增殖 ($P < 0.05$); 明显上调 OPG 和 Osterix 的表达 ($P < 0.05$), 同时能降低 RANKL 的表达 ($P < 0.05$)。**结论:**杜仲黄酮类化合物紫云英苷和黄芩素能促进 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞增殖, 并上调 Osterix 和 OPG/RANKL。

[关键词] 杜仲; 骨保护素; 成骨细胞; 成骨相关转录因子; 蛋白免疫印迹法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0180-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220180

Effects of Two Kinds of *Eucommia ulmoides* Flavonoids on Osteoblast OPG/RANKL and Osteogenic Transcription Factor

LAN Bo¹, LIU Ting¹, XIE Yu-min¹, WANG Ai-min², LI Yong-jun^{1*}

(1. Guizhou Province Key Laboratory of Drug Preparation, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;
2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine
and Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *Eucommia ulmoides* flavonoids astragaloside and baicalin on the expression of osteoblast specific transcription factor Osterix and the ratio of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (OPG/RANKL). **Method:** MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblasts were cultured with different concentrations of astragaloside, baicalin and vitamin D₃ for 24 h. MTT detection method was used to detect cell proliferation. The expression of Ca²⁺ was detected by ELISA. The expressions of OPG, RANKL, OST were detected by Western blotting. **Result:** Compared with the control group, astragaloside and baicalin can significantly promote the proliferation of MC3T3-E1 Subclone 14 ($P < 0.05$), increase the expression of OPG and Osterix obviously ($P < 0.05$), and reduce the expression of RANKL ($P < 0.05$). **Conclusion:** It shows that astragaloside and baicalin from *E. ulmoides* flavonoids can promote MC3T3 E1 Subclone 14 osteoblast proliferation,

[收稿日期] 20140621(004)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2013BAI11B01); 贵州省科技重大专项(黔科合重大专项字[2012]6009号); 贵州省中药现代化专项项目(黔科合中药字[2013]5062号)

[第一作者] 兰波, 硕士, 从事药理学研究, Tel:15085965162, E-mail: lanbo891210@sina.com

[通讯作者] *李勇军, 硕士, 研究生导师, 从事天然药物化学研究, Tel:0851-6756799, E-mail:474220755@qq.com

and raised Osterix and OPG/RANKL.

[**Key words**] *Eucommia ulmoides*; osteoprotegerin; osterix; osteoblasts; western blotting

骨质疏松症(osteoporosis)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,导致骨质脆性增加和易于骨折的全身性骨代谢性疾病。造成骨质疏松症的原因是骨吸收与骨形成的平衡被打破,导致无法维持正常骨量。核因子- κ B 受体活化因子配体(ligand of receptor activator of $\text{nf-}\kappa\text{B}$, RANKL)与成骨细胞骨保护素(osteoprotegerin, OPG)系统通过抑制破骨细胞的生成,来维持骨重建动态平衡,在骨重建的过程中扮演着重要的角色^[1]。成骨相关转录因子 Osterix 是近年来发现的参与成骨细胞分化形成的相关转录因子,已经被许多研究证明在成骨细胞成熟及向骨细胞分化中起到重要的作用^[2]。

杜仲是杜仲科植物杜仲的干燥树皮^[3],是我国名贵的中药材,其含有的药用化学成分可分为黄酮类、木质素类、环烯醚萜类等^[4]。杜仲具有增强骨密度,治疗骨质疏松等作用。近年来大量的文献研究表明总黄酮是杜仲改善骨质疏松症的主要有效成分之一^[5]。目前尚未见关于杜仲黄酮类化合物紫云英苷和黄芩素作用 OPG/RANKL 通路和 Osterix 治疗骨质疏松的报道,因此本实验从杜仲药材中制备了紫云英苷和黄芩素,并作用于 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞,观察紫云英苷和黄芩素对 Osterix 以及 OPG/RANKL 的影响,从而为今后进一步研究杜仲治疗骨质疏松的机制提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞系 小鼠 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞(中国科学院上海细胞库)。

1.2 药物及试剂 紫云英苷和黄芩素(自制),DMEM/F-2 培养基(美国 Hyclon,批号 NYH0944),胎牛血清(澳洲 Gibco,批号 03387),胰蛋白酶(美国 Hyclon,批号 SV30031.01),噻唑蓝(MTT,美国 MP biomedical,批号 102227);哺乳动物蛋白抽提试剂盒(批号 00011405),SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号 00011403),一步法快速 WB (HPR)试剂盒(批号 00041401),高灵敏度化学发光检测试剂盒(批号 00011401)均购自中国康为世纪公司;GAPDH (6CS) mAB (中国 Bioworld,批号 MB002);OPG 单克隆抗体(批号 C10052),RANKL 单克隆抗体(批号 C10052)和 Osterix 单克隆抗体(批号 C10064)均购自美国 Assay biotech 公司;Mouse Ca^{2+} ELISA E01C1177 试剂盒(中国蓝基公司,批号

E03R0098)。

1.3 仪器 Biomate 3S 高速冷冻离心机(美国 Thermo),Forma CO₂ 培养箱(美国 Thermo),D680 酶标仪(美国 Bio-Rad),蛋白电泳和印迹系统(美国 Bio-Rad),GBOX ChemiXL1.4 化学发光凝胶成像系统(英国 Syngene)。

2 方法

2.1 细胞培养 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞接种于含 10% 的 DMEM-F12 培养基中,于 5% CO₂,37 °C 的培养箱中培养,隔天换液。细胞 80% ~ 90% 汇合时传代。

2.2 细胞增殖检测 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,在 37 °C,5% CO₂ 条件下培养 24 h,弃去培养液。空白组加入不含药培养基,给药组加入质量浓度为 100, 80, 60, 30, 15, 7.5 mg·L⁻¹ 的含紫云英苷和黄芩素的培养基,阳性组加入 30 mg·L⁻¹ 的含维生素 D₃ 的培养基,每个浓度设置 6 个复孔。在加药培养 24 h 后,每孔加入 2.5 mg·L⁻¹ 的 MTT 溶液 10 μ L,继续培养 4 h 后弃去培养液,每孔再加入 DMSO 溶液 100 μ L,并用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处检测各孔的吸光度(A)。

2.3 钙离子检测 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞按每孔 5×10^4 个细胞接种于 24 孔板,培养 24 h 后,弃去培养液。对空白组加入培养基,给药组分别加入质量浓度为 80,40,7.5 mg·L⁻¹ 的含紫云英苷或黄芩素的培养基,继续培养 24 h 后弃去培养液,胰酶消化并离心。用 PBS 缓冲液清洗细胞沉淀 3 遍,然后用少量 PBS 缓冲液重悬细胞,反复冻融,裂解细胞,5 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清,-20 °C 或 -80 °C 分装保存备用。用 Mouse Ca^{2+} ELISA E01C1177 试剂盒进行钙离子检测。

2.4 OPG, RANKL 和 Osterix 的检测 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞按 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板,培养 24 h 后弃去培养液。对空白对照组加入培养基,给药组分别加入质量浓度为 80, 40, 7.5 mg·L⁻¹ 含紫云英苷或黄芩素的培养基,继续培养 24 h 后提取细胞总蛋白,并用 BCA 试剂盒检测蛋白含量。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并用 β -actin 作为内参,Western blotting 检测 OPG, RANKL 和 Osterix 的表达。

2.5 数据统计 所得数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理, 所得结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖情况 终质量浓度为 30, 15, 7.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫云英苷能促进 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的增殖, 与空白组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); 黄芩素作用 24 h 后, 各浓度组相较于空白组均有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$) 且黄芩素对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的增殖作用明显优于维生素 D_3 ($P < 0.05$)。见表 1, 2。

表 1 紫云英苷对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖 /%
空白	-	100
紫云英苷	7.5	118.66 \pm 0.31 ²⁾
	15	123.73 \pm 0.41 ²⁾
	30	126.72 \pm 0.33 ²⁾
	60	105.14 \pm 0.33
	80	105.26 \pm 0.40
100	104.44 \pm 0.34	
维生素 D_3	30	109.52 \pm 0.54 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

表 2 黄芩素对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖 /%
空白	-	100
黄芩素	7.5	108.56 \pm 0.43 ¹⁾
	15	111.51 \pm 0.50 ¹⁾
	30	123.12 \pm 0.29 ²⁾
	60	122.65 \pm 0.61 ²⁾
	80	125.55 \pm 0.31 ²⁾
100	123.96 \pm 0.71 ²⁾	
维生素 D_3	30	111.13 \pm 0.34 ¹⁾

3.2 钙离子检测 与空白组相比, 低浓度的紫云英苷对细胞钙离子分泌无明显影响, 但紫云英苷在中、高浓度能明显促进细胞钙离子分泌 ($P < 0.05$); 黄芩素低、中、高 3 个浓度均对成骨细胞钙离子的分泌具有显著的促进作用 ($P < 0.01$), 见表 3。

3.3 OPG, RANKL 检测 如图 1, 紫云英苷和黄芩

表 3 不同浓度的紫云英苷, 黄芩素对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞钙离子活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	钙离子活性 /%
空白	-	100
紫云英苷	7.5	104.54 \pm 0.68 ¹⁾
	40	109.13 \pm 0.55 ¹⁾
	80	109.84 \pm 0.61 ¹⁾
黄芩素	7.5	124.22 \pm 0.54 ²⁾
	40	125.04 \pm 0.71 ²⁾
	80	132.42 \pm 0.43 ²⁾

素在低、中浓度均能使成骨细胞 OPG 表达增高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 4, 图 1。与空白组相比, 紫云英苷在高、中质量浓度时能降低 RANKL 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 而黄芩素在低、中、高 3 个浓度都能降低 RANKL 蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 4, 图 1。紫云英苷和黄芩素在低、中、高 3 个浓度作用于成骨细胞后, 均能使 OPG/RANKL 有明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

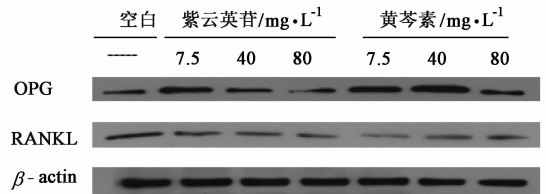


图 1 紫云英苷和黄芩素对成骨细胞中 OPG 和 RANKL 蛋白表达的影响

表 4 紫云英苷、黄芩素对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞 OPG, RANKL, OPG/RANKL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	OPG $/\beta\text{-actin}$	RANKL $/\beta\text{-actin}$	OPG $/\text{RANKL}$
空白	-	0.36 \pm 0.22	0.57 \pm 0.34	0.63 \pm 0.16
紫云英苷	7.5	0.89 \pm 0.14 ²⁾	0.29 \pm 0.26	3.06 \pm 0.27 ²⁾
	40	0.50 \pm 0.21 ¹⁾	0.24 \pm 0.13 ¹⁾	2.08 \pm 0.29 ²⁾
	80	0.43 \pm 0.18	0.23 \pm 0.18 ¹⁾	1.86 \pm 0.18 ¹⁾
黄芩素	7.5	1.03 \pm 0.14 ²⁾	0.13 \pm 0.11 ²⁾	7.92 \pm 0.21 ²⁾
	40	1.21 \pm 0.27 ²⁾	0.25 \pm 0.44 ¹⁾	4.84 \pm 0.32 ²⁾
	80	0.51 \pm 0.18 ¹⁾	0.24 \pm 0.27 ¹⁾	2.13 \pm 0.15 ¹⁾

3.4 Osterix 检测 与空白组相比, 紫云英苷对 Osterix 的表达具有促进作用, 但效果不明显; 而黄芩素低、中、高 3 个浓度均对 Osterix 蛋白表达具有明显的上调作用 ($P < 0.01$), 见表 5, 图 2。

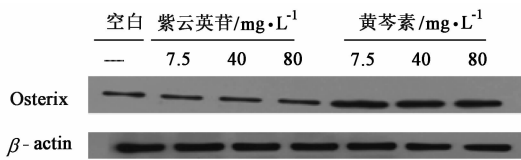


图2 紫云英苷和黄芩素对成骨细胞中 Osterix 蛋白表达的影响

表5 紫云英苷、黄芩素对 MC3T3-E1

Subclone 14 成骨细胞 Osterix 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	Osterix/β-actin
空白	-	0.41 ± 0.53
紫云英苷	7.5	0.42 ± 0.33
	40	0.41 ± 0.24
	80	0.42 ± 0.26
黄芩素	7.5	1.23 ± 0.15 ²⁾
	40	1.05 ± 0.21 ²⁾
	80	1.06 ± 0.17 ²⁾

4 讨论

骨质疏松症是骨吸收与骨形成平衡的失调导致的骨量低下以及骨组织结构异常的代谢性骨病^[6]。破骨细胞抑制因子,膜受体与核因子κ骨受体活化因子配体(OPG/RANK/RANKL)是近年来发现的可调节骨吸收与骨形成、成骨细胞与破骨细胞平衡的重要因子。RANKL是影响骨吸收的关键因子,其通过与破骨细胞前体上的RANK相结合,激活CN/NFAT,PKB等通路,从而抑制破骨细胞前体分化为成熟的破骨细胞。OPG可抑制骨吸收,常高表达于成骨细胞。成骨细胞通过分泌OPG,来和RANKL竞争性结合RANK,抑制CN/NFAT通路,减少破骨细胞的生成,达到抑制骨吸收的效果^[7-8]。OPG/RANKL是决定人体骨量的关键,如果比值下降,则会引起许多与骨质有关的骨代谢的疾病^[10-12];当比值上调即能降低破骨细胞的分化成熟。

成骨相关转录因子(Osterix)是近年来发现的参与成骨细胞分化形成的相关转录因子,在胎盘期和出生后的骨发育或是骨成熟过程中起到了刺激成骨细胞成熟分化的作用。Osterix可以激活Wnt/β-catenin信号通路从而促进成骨细胞的形成与骨量的增加。同时Osterix的上调还能间接影响BMP-2, p38 MARK, JNK等改善骨质疏松的通路来达到综合改善骨质疏松的目的。

杜仲为贵州地产药材。大量研究表明杜仲对骨质疏松症具有明显的改善效果,并且杜仲中的黄酮

类化合物是治疗和改善骨质疏松的主要有效成分^[9]。但迄今为止,尚无文献报道杜仲黄酮类化合物紫云英苷和黄芩素具有改善骨质疏松的功效,故本实验从杜仲中提取紫云英苷和黄芩素,来研究它们抗骨质疏松的药效及相关机制。

通过本实验可知,紫云英苷和黄芩素对MC3T3-E1 Subclone 14成骨细胞增殖有明显的促进作用,进一步的研究发现紫云英苷和黄芩素能明显促进成骨细胞钙离子的分泌,这表明在一定程度上紫云英苷和黄芩素可以促进骨细胞的分化成熟,并改善骨质疏松导致的骨量流失情况。结果发现,紫云英苷低、中浓度能显著性上调OPG的表达但在高浓度下却未见明显上调作用。Brzoska等的研究发现OPG蛋白的表达与细胞增殖情况成正比^[13],结合紫云英苷促细胞增殖研究结果,笔者可以推断高浓度紫云英苷对OPG蛋白没有起到明显上调的作用可能与其促细胞增殖效果不明显相关。低浓度的紫云英苷对RANKL蛋白的表达没有显著影响,可能是因为给药浓度过低而未能达到调节RANKL蛋白表达的阈值。黄芩素在低、中、高浓度下均能显著性上调OPG蛋白并且对RANKL蛋白有明显的抑制作用,研究结果提示:黄芩素在低浓度时药效最好,随着浓度的增加药效随之降低。本研究证明了紫云英苷和黄芩素能显著上调OPG的表达,并且同时能显著降低RANKL的蛋白表达,从而上调OPG/RANKL。此外,黄芩素还能显著提高Osterix的蛋白表达并且体现出浓度依耐性,提示笔者黄芩素可通过上调Osterix蛋白表达从而来影响BMP2/Smads/Msx2通路^[14-15]。通过比对试验数据发现,与紫云英苷相比,黄芩素不仅促进成骨细胞增殖效果更显著,而且其在低浓度下就能对各种关键性蛋白起到明显的调节作用,同时在制备化合物的过程中黄芩素的回收率也远远高于紫云英苷,这些发现提示,相较于紫云英苷,黄芩素更适合用作为杜仲质量控制的指标。综上所述,紫云英苷和黄芩素能促进成骨细胞增殖、分化成熟并提高OPG/RANKL,上调Osterix的表达。OPG/RANKL的提高和Osterix蛋白表达的上调提示杜仲黄酮类化合物紫云英苷和黄芩素不仅能作用于OPG/RANKL/RANK系统,还可能通过影响BMP2/Smads/Msx2通路来改善骨质疏松的作用,但其具体作用机制尚未明确。本实验为杜仲抗骨质疏松药效物质基础的研究以及作用机制提供了实验基础和理论依据。