

# 健骨颗粒含药血清对大鼠成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白的影响

吴银生<sup>1</sup> 林燕萍<sup>1</sup> 卢天祥<sup>1</sup> 林煜<sup>1</sup> 黄云梅<sup>2</sup> 黄美雅<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨健骨颗粒含药血清对成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白的影响。方法 采用酶消化法培养 SD 大鼠成骨细胞,健骨颗粒含药血清干预,以生理盐水大鼠血清为对照,运用流式细胞术检测成骨细胞增殖周期,免疫细胞化学法、RT-PCR 法检测成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白细胞周期蛋白 (Cyclin) D1、CDK4、P21 表达。结果 20% 健骨颗粒含药血清能推进成骨细胞增殖周期进程,促进其增殖;成骨细胞核中存在 Cyclin D1、CDK4、P21 等蛋白表达;与生理盐水血清比较,健骨颗粒含药血清干预 24、48、72 h 均能提高成骨细胞 Cyclin D1、CDK4 蛋白及 mRNA 表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而降低 P21 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 健骨颗粒含药血清能从 mRNA 及蛋白层面上提高体外培养成骨细胞 Cyclin D1、CDK4 表达,抑制负性调节因子 p21 的表达,调节 G<sub>1</sub> 期调节蛋白,促进成骨细胞增殖。

**关键词** 成骨细胞;细胞周期蛋白 D1;细胞周期蛋白质依赖激酶;癌基因蛋白 P21;健骨颗粒

**Effects of Jiangu Granule Containing Serum on the Cyclins in Rat's Osteoblast at G<sub>1</sub> Phase** WU Yin-sheng, LIN Yan-ping, LU Tian-xiang, et al *Osteopathy Institute, Fujian Academy of Integrative Medicine, Fuzhou (350108)*

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the effects of Jiangu granule containing serum (JGG-serum) on the cyclins in rat's osteoblast at G<sub>1</sub> phase. **Methods** Osteoblasts isolated by enzymatic digestion from SD rats were cultured and intervened with JGG-serum or normal saline (as control) respectively. Cell generation cycle was detected by flow cytometry, and expressions of Cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), oncogene protein (P21) in the osteoblast were detected dynamically using immuno-cytochemical and RT-PCR technique. **Results** As compared with the control, the cell generation cycle and cell proliferation were proceeding quicker in the JGG-serum (20%) intervention group; with higher protein and mRNA expressions of Cyclin D1 and CDK4, as well as much lowered expressions of P21 in nuclei of osteoblast detected at all time points (24 h, 48 h and 72 h after treatment,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** JGG-serum can adjust the G<sub>1</sub> phase cyclins in osteoblast cultured *in vitro*, increase the mRNA and protein expressions of Cyclin D1 and CDK4, and inhibit P21 expression, so as to accelerate the proliferation of osteoblast.

**KEYWORDS** osteoblast; cyclin D1; cyclin-dependent kinase; oncogene protein P21; Jiangu Granule

绝经后雌激素水平降低改变成骨细胞、破骨细胞的功能、数量及寿命,从而影响骨形成、骨吸收耦联进而导致绝经后骨质疏松症的形成已得到证实<sup>[1]</sup>。成骨细胞的数量与细胞的增殖关系密切,细胞增殖周期

的进程主要受到周期调节蛋白——细胞周期素 (cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶 (cyclin dependent kinase, CDK) 和细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 (cyclin dependent kinase inhibitor, CKI) 的调控,其中以对 G<sub>1</sub> 期和 G<sub>1</sub>/S 期检查点的调控最为重要<sup>[2]</sup>。前期实验研究证实,补肾健脾中药健骨颗粒能提高大鼠 E<sub>2</sub> 水平,增加骨组织中成骨细胞数量,增加骨形成,有效防治实验性绝经后骨质疏松症<sup>[3,4]</sup>。为进一步阐明健骨颗粒防治绝经后骨质疏松症的作用机制,本实验拟从细胞周期素的角度探讨健骨颗粒含药血清对成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白 Cyclin D1、CDK4、P21 的影响,为补肾健脾法治疗绝经后骨质疏松症提供理论依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 30572402);福建省科技厅社会发展处重点资助项目 (No. 2009Y0028);福建省科技厅青年人才资助项目 (No. 2008F3054);陈可冀中西医结合发展基金·福建省中西医结合老年性疾病重点实验室资助项目 (No. ckj2008038o2008J1004-01)

作者单位:1. 福建中西医结合研究院骨病研究所 (福州 350108); 2. 福建中西医结合研究院基础重点实验室

通讯作者:林燕萍, Tel:0591-22861556, E-mail:lyp66@126.com

## 材料与方 法

1 动物 新生 SD 大鼠 2 只(由福建医科大学动物房提供);3 月龄清洁级雄性 SD 大鼠 20 只(由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供)。

2 药物 健骨颗粒由煨狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参、山药等组成,原药材统一由福建省医药公司提供,福建中医药研究院中试车间加工制备,经浸泡煎煮、过滤浓缩、喷雾干燥、整粒分装制成颗粒冲剂,每克含原生药 2.9 g。

3 试剂及仪器 0.25% 胰蛋白酶、I 型胶原酶、低糖 DMEM 培养基、小牛血清、青/链霉素(新西兰 Hyclone 公司产品);即用型兔抗大鼠 Cyclin D1 多克隆抗体、CDK4 多克隆抗体、小鼠抗大鼠 P21 多克隆抗体(SANTA CRUZ 公司产品);SABC 试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术有限公司);CycleTESTTM Plus DNA Reagent Kit(美国 Becton Dickinson 公司);噻唑蓝(MTT, Sigma 公司);反转录试剂盒、TRIZOL(MBI Fermentas 公司);PCR 引物(上海生工生物技术有限公司)。二氧化碳恒温培养箱(BB16/BB5060 型,德国 Heraeus 公司);AIR TECH 无菌操作台(苏净集团安泰公司);Olympus 倒置相差显微镜(日本 TKO 光学仪器株式会社);Du650 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司);9600DNA 扩增仪(美国 PE 生物系统公司);WD-9403c 紫外透射分析仪、三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

### 4 方 法

4.1 含药血清制备 取 3 月龄 SD 大鼠 20 只,随机分为中药组和对照组,每组各 10 只,中药组给予健骨颗粒 2 g/(kg·d),以生理盐水 2 mL 溶解灌胃,对照组予生理盐水 2 mL/d 灌胃,连续灌胃 7 天,于最后 1 次灌胃后 1 h 腹主动脉无菌取血,常温下静置 1 h,3 000 r/min 离心 10 min 后取同组血清混合,再离心 1 次,56 ℃ 灭活 30 min,过滤除菌,-20 ℃ 保存备用。

4.2 成骨细胞培养、纯化与鉴定 取新生 SD 大鼠 2 只,采用酶消化法分离收集颅骨成骨细胞进行传代培养,差速贴壁法进行纯化,以重氮盐法碱性磷酸酶染色、钙化结节茜素红染色及形态学观察鉴定培养的细胞为成骨细胞。

4.3 健骨颗粒含药血清对成骨细胞增殖的影响 取第 3 代细胞以  $2 \times 10^3$ /孔接种于 96 孔板中,分别加入含 5%、10%、15%、20%、25%、30% 健骨颗粒含药

血清或生理盐水血清的 DMEM 培养基,每个浓度设 6 孔,干预 72 h 后 MTT 法检测比较不同浓度含药血清和生理盐水血清对细胞增殖的影响,并得出最佳含药血清浓度。

4.4 成骨细胞分组、干预 取第 3 代细胞以  $1 \times 10^5$ /mL 传代接种于培养皿(用于流式细胞术和 RT-PCR 检测)或细胞爬片(用于免疫细胞化学检测),分为中药组和对照组,分别加入含最佳浓度健骨颗粒含药血清的 DMEM 培养基和相应浓度生理盐水血清培养基,培养 24、48、72 h 后收集细胞检测。

4.5 流式细胞术检测 按试剂说明书提供的实验步骤,上流式细胞仪检测,ModFit 软件分析 DNA 数据,读取  $G_0/G_1$  期、S 期、 $G_2/M$  期细胞数,计算细胞增殖指数(Proliferation Index, PI)。

4.6 免疫细胞化学法检测 采用免疫细胞化学 SABC 法,DAB 染色检测 Cyclin D1、CDK4、P21 蛋白的表达(具体步骤根据试剂说明书),以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。结果判断标准:显微镜下观察,以细胞核内出现明确的棕黄色颗粒为阳性细胞,每张细胞爬片随机选取 5 个视野,计数每个视野成骨细胞中阳性细胞的比例,然后计算 5 个视野的平均百分数,根据阳性细胞百分率判断结果。

4.7 RT-PCR 法检测 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,根据反转录试剂盒提供实验步骤进行逆转录,合成 Cyclin D1、CDK4、p21 扩增引物,进行 PCR 反应。PCR 引物序列:Cyclin D1:上游 5'-CTGAC TGC-CG AGAAG TTGTG-3',下游 5'-AAGTG CGTTG TGCGG TAG-3';CDK4:上游 5-AGACC AGGAC CTACC GACAT AC-3',下游 5'-GCGAA GATAC AGCCA ACACT-3';p21:上游 5'-CACGC TTCGA GAAGA TTG-GA C-3',下游 5'-TGACA GAGCC ATCCA TTCCC-3';内参  $\beta$ -actin:上游 5'-CGGTC AGGTC ATCAC TATCG-3',下游:5'-AGGAG CCAGG GCAGT AATCT-3'。PCR 产物加入溴芬蓝进行琼脂糖凝胶电泳,电流 10 mA,电压 100 V,电泳时间 1 h,电泳结果通过凝胶图像分析系统对条带进行 PCR 定量;样本 Cyclin D1 mRNA 等产物的 PCR 定量与内参  $\beta$ -actin 的 PCR 定量比值,为该样本 mRNA 在成骨细胞中的相对含量。

5 统计学方法 实验数据运用 SPSS 13.0 软件包分析,参数值采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间数据比较采用单因素方差分析。

## 结 果

1 两组成骨细胞增殖比较(表 1) 对照组当生

表 1 两组不同浓度血清对成骨细胞增殖的比较 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	成骨细胞增殖					
		5%	10%	15%	20%	25%	30%
对照	6	0.58 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.05
中药	6	0.58 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.05	0.63 ± 0.02*	0.62 ± 0.03	0.61 ± 0.10

注:与对照组比较, \*P < 0.05

表 2 两组成骨细胞细胞周期分布 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	G0/G1 期 (%)	S 期 (%)	G2/M 期 (%)	PI
对照	6	干预 24 h	95.05 ± 0.36	4.77 ± 0.35	0.18 ± 0.01	4.95 ± 0.36
		干预 48 h	83.78 ± 1.82*	9.62 ± 1.01*	6.07 ± 1.02*	16.23 ± 1.82*
		干预 72 h	67.31 ± 1.24 <sup>△</sup>	20.21 ± 0.16 <sup>△</sup>	12.47 ± 1.32 <sup>△</sup>	32.68 ± 1.23 <sup>△</sup>
中药	6	干预 24 h	89.71 ± 1.87 <sup>▲▲</sup>	6.99 ± 1.34 <sup>▲</sup>	3.30 ± 1.32 <sup>▲▲</sup>	10.29 ± 1.88 <sup>▲▲</sup>
		干预 48 h	77.17 ± 1.90 <sup>*▲▲</sup>	13.03 ± 1.01 <sup>*▲▲</sup>	9.80 ± 0.90 <sup>*▲▲</sup>	22.83 ± 1.90 <sup>*▲▲</sup>
		干预 72 h	62.43 ± 2.22 <sup>△▲▲</sup>	23.68 ± 1.05 <sup>△▲▲</sup>	13.89 ± 1.49 <sup>△</sup>	37.57 ± 2.22 <sup>△▲▲</sup>

注:与本组干预 24 h 比较, \*P < 0.01; 与本组干预 48 h 比较, <sup>△</sup>P < 0.01; 与对照组同期比较, <sup>▲</sup>P < 0.05, <sup>▲▲</sup>P < 0.01

理盐水血清浓度增加时, 增殖速度改变不明显。中药组细胞随健骨颗粒含药血清浓度增加而增殖加快, 并以 20% 时增殖速度最快, 与同浓度对照组比较差异有统计学意义 (P < 0.05)。两组当血清浓度 > 20% 时, 细胞增殖速度反而下降, 但组内差异无统计学意义。

2 两组成骨细胞周期分布比较(表 2) 两组成骨细胞周期分布随着培养时间的推移以及血清干预而发生变化, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例下降, 组内不同时期比较差异有统计学意义 (P < 0.01), 而 S 期、G<sub>2</sub>/M 期细胞比例上升, PI 升高 (P < 0.01), 其中以中药组变化显著, 与同期对照组比较, 除干预 72 h 的 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例外, 其余差异均有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01)。

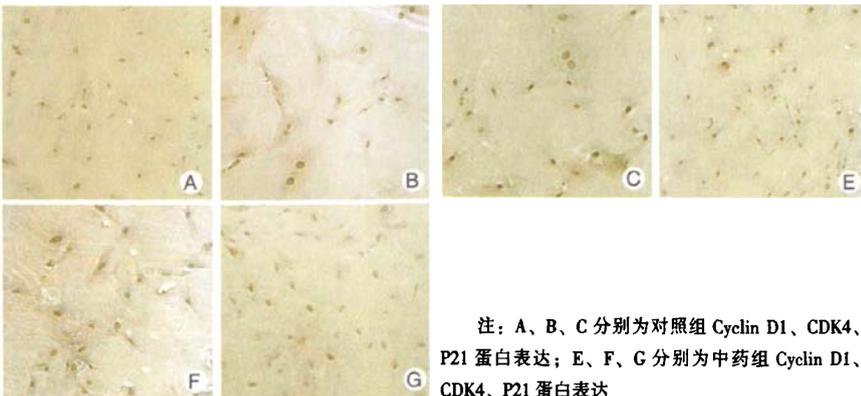
3 两组 Cyclin D1、CDK4、P21 蛋白表达比较(表 3, 图 1) 棕黄色的 Cyclin D1、CDK4、P21 阳性颗粒在成骨细胞核中表达。干预 24、48、72 h, 中药组 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达比例均高于对照组, 两组比较差

异有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01), 且随干预时间的推移, 其表达呈增高趋势, 组内不同干预时间比较差异有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01); P21 蛋白阳性表达随干预时间的延长呈下降趋势 (P < 0.05, P < 0.01), 中药组成骨细胞表达较弱, 且下降幅度大于对照组, 两组比较, 干预 48、72h 时差异有统计学意义 (P < 0.01)。

表 3 两组成骨细胞 Cyclin D1、CDK4、P21 蛋白表达 (%  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	Cyclin D1	CDK4	P21
对照	6	干预 24 h	44.55 ± 1.10	6.61 ± 0.44	35.68 ± 1.46
		干预 48 h	50.82 ± 1.62*	10.96 ± 1.02*	28.01 ± 1.17*
		干预 72 h	61.04 ± 6.04 <sup>△△</sup>	18.16 ± 0.68 <sup>△△</sup>	19.42 ± 1.37 <sup>△△</sup>
中药	6	干预 24 h	49.08 ± 1.38 <sup>▲</sup>	8.47 ± 1.14 <sup>▲</sup>	33.90 ± 2.11
		干预 48 h	62.44 ± 4.90 <sup>*▲▲</sup>	15.21 ± 1.43 <sup>*▲▲</sup>	23.80 ± 1.60 <sup>*▲▲</sup>
		干预 72 h	68.00 ± 3.15 <sup>△▲▲</sup>	23.89 ± 2.01 <sup>△▲▲</sup>	14.47 ± 1.38 <sup>△▲▲</sup>

注:与本组干预 24 h 比较, \*P < 0.01; 与本组干预 48 h 比较, <sup>△</sup>P < 0.05, <sup>△△</sup>P < 0.01; 与对照组比较, <sup>▲</sup>P < 0.05, <sup>▲▲</sup>P < 0.01



注: A、B、C 分别为对照组 Cyclin D1、CDK4、P21 蛋白表达; E、F、G 分别为中药组 Cyclin D1、CDK4、P21 蛋白表达

图 1 两组成骨细胞干预 48 h Cyclin D1、CDK4、P21 蛋白表达(SABC 法, ×100)

4 两组 Cyclin D1、CDK4、p21 mRNA 的表达(表 4) 随着培养时间的推移, 两组成骨细胞 Cyclin D1、CDK4 mRNA 的表达量均呈递增趋势, 组内不同干预时间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与对照组比较, 中药组干预 48、72 h 的 Cyclin D1、CDK4 mRNA 的表达均明显高于同期对照组, 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); P21 mRNA 的表达量随培养时间的推移而降低, 且中药组明显低于对照组, 干预不同时间两组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 4 两组成骨细胞 Cyclin D1、CDK4、P21 mRNA 表达 (INT/mm<sup>2</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	Cyclin D1	CDK4	p21
对照	6	干预 24 h	0.42 ± 0.19	1.20 ± 0.12	1.37 ± 0.37
		干预 48 h	0.67 ± 0.13*	1.50 ± 0.20*	1.22 ± 0.14
		干预 72 h	0.87 ± 0.15 <sup>△</sup>	1.61 ± 0.12	1.12 ± 0.18*
中药	6	干预 24 h	0.44 ± 0.11	1.41 ± 0.23 <sup>▲</sup>	1.10 ± 0.18 <sup>▲▲</sup>
		干预 48 h	0.92 ± 0.18 <sup>**▲</sup>	1.78 ± 0.20 <sup>**▲</sup>	0.81 ± 0.11 <sup>*▲▲</sup>
		干预 72 h	1.16 ± 0.18 <sup>△▲▲</sup>	1.89 ± 0.25 <sup>▲</sup>	0.75 ± 0.16 <sup>▲</sup>

注: 与本组干预 24 h 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与本组干预 48 h 比较, <sup>△</sup> $P < 0.01$ ; 与对照组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

### 讨 论

本实验结果显示, 低浓度健骨颗粒含药血清干预成骨细胞增殖速度较慢, 随着浓度的增高, 细胞增殖速度加快, 在含药血清浓度达到 20% 时, 增殖速度最快, 与对照组比较差异有统计学意义。

PI 是反映细胞增殖的重要指标之一, 显示 DNA 合成速度和细胞增殖情况<sup>[5]</sup>。本实验运用流式细胞术检测体外培养成骨细胞周期分布发现, 健骨颗粒含药血清能促使成骨细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期, 使 S 期和 G<sub>2</sub>/M 的细胞比例及 PI 指数明显高于对照组。提示健骨颗粒含药血清可以促使更多体外培养成骨细胞迅速进入增殖周期, 并推动细胞周期的进程, 促进成骨细胞增殖。

G<sub>1</sub>/S 检查点是细胞周期中 DNA 合成起始转换点, 在这一转换点之前或与此同时, 细胞要做出是停留于 G<sub>1</sub> 期还是继续进入另一轮分裂的抉择<sup>[6]</sup>。Cyclin D1、CDK4、P21 等 G<sub>1</sub> 期调节蛋白在 G<sub>1</sub> 期和 G<sub>1</sub>/S 期检查点发挥着直接调控作用。Cyclin D1 被认为是 G<sub>1</sub> 期细胞增殖信号的关键蛋白, 它激活 CDK4、CDK6, 使细胞通过 G<sub>1</sub> 进入 S 期。P21 则是 CKI 的重要成员, 其 N 端能结合 CDK, 抑制细胞从 G<sub>1</sub> 期向 S 期推进, 使细胞阻滞于 G<sub>1</sub>/S 期检查点<sup>[7]</sup>。本实验结果显示, 体外培养成骨细胞有 Cyclin D1、CDK4 和 P21 蛋白表达, 主要定位在细胞核。中药组成骨细胞 Cyclin D1、CDK4 蛋白及其 mRNA 表达明显高于对照组, 而

P21 蛋白及其 mRNA 表达则低于后者, 提示健骨颗粒含药血清能提高成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白 Cyclin D1、CDK4 的表达, 抑制负性调节因子 P21 的表达, 促使成骨细胞顺利通过 G<sub>1</sub>/S 检查点, 促进成骨细胞增殖。

达到防治骨质疏松症目的, 这可能是补肾健脾中药防治绝经后骨质疏松症的作用机制之一。

### 参 考 文 献

- [1] 谢肇, 李起鸿. 绝经后骨质疏松症的细胞凋亡及其调控机制. 中华老年医学杂志 [J]. 2004, 23 (6): 436-438.  
Xie Z, Li QH. Apoptosis in postmenopausal osteoporosis and its regulatory mechanism [J]. Chin J Geriatr, 2004, 23 (6): 436-438.
- [2] 桂建芳. RNA 加工与细胞周期调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 79.  
Gui JF. RNA processing and cell cycle regulation [M]. Beijing: Science Press, 1998: 79.
- [3] 林燕萍, 周瑞祥, 李异龙, 等. 健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型鼠尿脱氧吡啶酚及骨组织整合素  $\beta$ -1 mRNA 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26 (5): 435-438.  
Lin YP, Zhou RX, Li YL, et al. Effect of Jiangu Granule on levels of urinary deoxypyridinoline and osseous integrin  $\beta$ <sub>1</sub> mRNA expression in ovariectomized osteoporosis model rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2006, 26 (5): 435-438.
- [4] 林燕萍, 周瑞祥, 王和鸣, 等. 健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型鼠血清 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 的影响 [J]. 中国骨伤, 2002, 15 (8): 465-467.  
Lin YP, Zhou RX, Wang HM, et al. Effect of Jiangu Granula on serum TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> in osteoporosis models of ovariectomized rats [J]. China J Orthop Trauma, 2002, 15 (8): 465-467.
- [5] 吴丹, 丁寅, 王琪. 流体剪切力对大鼠成骨细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 临床口腔医学杂志, 2007, 23 (4): 197-199.  
Wu D, Ding Y, Wang Q. Effects of fluid shear stress on the proliferation and cell cycle of rat osteoblasts *in vitro* [J]. J Clin Stomatol, 2007, 23 (4): 197-199.
- [6] Smith E, Redman RA, Logg CR, et al. Glucocorticoids inhibit developmental stage-specific osteoblast cell cycle [J]. J Biological Chem, 2000, 275 (6): 19992-20001.
- [7] 余卫, 张涇. 细胞周期与细胞凋亡共同的调节分子——Survivin 蛋白 [J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2003, 24 (6): 41-44.  
Yu W, Zhang H. A common regulator of cell cycle and apoptosis-survivin [J]. J Jinan Univ (Natural Sci Med), 2003, 24 (6): 41-44.

(收稿: 2009-06-16 修回: 2010-02-02)