

· 基础研究 ·

白芍总苷对小鼠成骨细胞增殖、分化和矿化的影响

赵向绒¹ 王海芳² 刘 杨¹ 霍雪萍¹ 梁导艳¹ 孙晶莹¹ 胡 军¹ 武 敏¹

摘要 **目的** 研究白芍总苷(TGP)对小鼠成骨细胞(MC3T3-E1)增殖、分化和矿化的影响。**方法** 采用 MTT 法和流式细胞术检测 TGP 对 MC3T3-E1 细胞增殖和细胞周期的影响;诱导 MC3T3-E1 成骨分化,通过检测碱性磷酸酶(ALP)活性和 RT-PCR 法检测人类相关转录因子 2(Runx2)基因表达,分析 TGP 对成骨分化的影响,采用茜素红染色分析 TGP 对矿化的影响。**结果** 3、10 $\mu\text{g/L}$ TGP 均能促进 MC3T3-E1 细胞增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);10 $\mu\text{g/L}$ TGP 可使 G1 期细胞的比例减少, S + G2 期细胞的比例增加 ($P < 0.05$);与对照组比较, TGP 处理组细胞的 ALP 活性和 Runx2 表达水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且矿化结节量明显增加。**结论** TGP 具有促进 MC3T3-E1 细胞增殖和分化成熟的能力,为炎性骨质疏松的治疗策略提供了实验依据和治疗思路。

关键词 白芍总苷;成骨细胞;细胞增殖;成骨分化;矿化;人类相关转录因子 2

Effect of Total Glucosides of Peony on the Proliferation, Differentiation, and Mineralization of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells ZHAO Xiang-rong¹, WANG Hai-fang², LIU Yang¹, HUO Xue-ping¹, LIANG Dao-yan¹, SUN Jing-ying¹, HU Jun¹, and WU Min¹ 1 Central Laboratory, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an (710068); 2 Academy of Integrative Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi (712046)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of total glucosides of peony (TGP) on the proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3-E1 osteoblastic cells. **Methods** The effects of TGP on the proliferation and cell cycle of MC3T3-E1 osteoblastic cells were determined by MTT assay and flow cytometry. The differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells was analyzed by measuring the activity of alkaline phosphatase (ALP), and the mRNA expression level of Runt-related transcription factor 2 (Runx2) in MC3T3-E1 cells was detected using RT-PCR. The effects of TGP on mineralized nodules were observed by Alizarin red S (ARS) staining. **Results** The proliferation of MC3T3-E1 cells was significantly promoted by 3 $\mu\text{g/L}$ and 10 $\mu\text{g/L}$ TGP treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). 10 $\mu\text{g/L}$ TGP reduced the proportion of cells in G1 phase and increased the proportion of cells in S + G2 phase ($P < 0.05$). Moreover, both ALP activity and mRNA expression level of Runx2 were improved in TGP-treated cells, as compared with that in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, the formation of mineralized nodules was significantly enhanced in the TGP-treated group. **Conclusion** TGP had the ability to promote the proliferation and differentiation of osteoblasts, which provided evidence and ideas for treatment of inflammation-associated osteoporosis.

KEYWORDS total glucoside of peony; osteoblastic cell; cell proliferation; osteoblastic differentiation; mineralization; Runt-related transcription factor 2

骨骼的新陈代谢是骨吸收和骨形成之间平衡不断重建的过程,成年人骨组织以每年 5% ~ 15% 的速率

更新。在慢性炎症环境下,如类风湿关节炎、炎性肠病、牙周炎和慢性阻塞性肺疾病,炎症介质的存在,打破了骨重建平衡,破骨细胞介导的骨吸收过程强于成骨细胞介导的骨形成过程,造成持续性骨量丢失,统称为炎症相关骨质疏松症^[1]。

白芍为毛茛科白芍属植物芍药的去外皮干燥根,具有养血柔肝、敛阴、收汗、缓急止痛等功效^[2],是中医治疗“骨痹(骨关节炎)”的著名方剂“骨痹汤”中的

基金项目:陕西省中医管理局中医药科研项目(No. 15-ZY025)

作者单位:1. 陕西省人民医院中心实验室(西安 710068); 2. 陕西中医药大学整合医学研究院(陕西 712046)

通讯作者:武 敏, Tel: 029-85251331, E-mail: wumin175@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20190910. 291

重要药材。白芍总苷(total glucosides of peony, TGP)是从中药白芍中提取的有效成分,因其调节免疫、抗炎和止痛的功效,被广泛用于炎性骨关节疾病的临床治疗^[3-5]。TGP 阻止骨丢失的研究主要集中在抑制破骨细胞重吸收方面,而在直接促成骨方面报道甚少。本实验旨在观察 TGP 对成骨细胞、细胞增殖、分化和矿化的影响,证实 TGP 的直接促成骨作用。

材料与方法

1 细胞株 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 (购自美国 ATCC)。

2 药物 TGP (FY1589, 含量 $\geq 98\%$, 南通飞宇生物科技有限公司)。将 TGP 用二甲基亚砜(DMSO)配置为 100 mg/L 的储存液,使用前用培养基分别稀释至 3、10 $\mu\text{g/L}$ 两个药物浓度。

3 主要试剂及仪器 α -MEM 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 北京元亨圣马公司);噻唑蓝(MTT, 美国 Thermo Fisher 公司产品);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(南京建成生物);细胞周期检测试剂盒(北京康为世纪公司); β -甘油磷酸钠(陕西依科生物); α -抗坏血酸(德国 Sigma 公司);PCR 引物(上海生工生物有限公司);反转录和 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);超净工作台(苏净安泰公司);CO₂培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);倒置显微镜(重庆光电公司);酶标仪(美国 BioTek 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

4 方法

4.1 细胞培养 以含 10% FBS、1% 青链霉素的 α -MEM 培养基培养 MC3T3-E1 细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂培养箱中培养,待细胞铺满 80%~90%时,用 0.25% 胰蛋白酶(含有 0.01% EDTA)消化传代培养。

4.2 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 将对数生长期的 MC3T3-E1 细胞用胰蛋白酶进行消化,以每孔 5×10^3 个的浓度接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后用无血清 α -MEM 培养基培养过夜。次日,细胞分组,更换为含有 TGP (0、3、10 $\mu\text{g/L}$) 的新鲜培养液,每组设 6 个复孔,每孔 100 μL 。药物分别作用 24、48、72 h 后,吸出培养上清,每孔分别加入 100 μL 无血清 α -MEM 培养基和 20 μL MTT (5 g/L),继续孵育 4 h。弃去孔内上清,每孔加入 150 μL 的 DMSO,室温震荡 10 min,使结晶充分溶解,用酶标仪在 490 nm 波长处检测各孔吸光度值(OD 值)。

4.3 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞周期的影响 消化对数生长期的 MC3T3-E1 细胞,以 1×10^6 个的细胞量接种 6 cm 的培养皿 3 个,24 h 后按“4.2”所述的实验分组分别更换新鲜培养液。48 h 后收集细胞,分别用 5 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤细胞,再用预冷的 70% 乙醇固定细胞过夜。次日以预冷的 PBS 再洗涤 1 次细胞,每管细胞样品加入 0.4 mL 配制好的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液(PI 染液的配制按照试剂盒说明书),室温避光孵育 25 min 后进行流式细胞仪检测。

4.4 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响 取对数生长期的 MC3T3-E1 细胞,以 2×10^5 个/孔的细胞量接种 6 孔板,每孔加入培养液 1 mL;待细胞贴壁后用无血清 α -MEM 培养基培养过夜,次日按实验分组(0、3、10 $\mu\text{g/L}$ TGP)更换为新鲜含药培养液,每组 4 个复孔。在 CO₂培养箱培养 48 h 后,弃掉培养上清,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 500 μL 1% 的 TritonX-100 裂解细胞,冰上放置 15 min,反复吹打细胞,细胞刮刮净孔底,收集液体转移至 1.5 mL 离心管中反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 5 min,将上清转移至另一干净离心管中,用 BCA 试剂盒测定裂解液中的蛋白浓度,按照 ALP 试剂盒操作方法检测裂解液的 ALP 活性。

4.5 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞 Runx2 mRNA 表达水平的影响 将 MC3T3-E1 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,分别设置 0 (对照组)、3、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGP 3 个组,每组 3 个复孔。药物处理 24 h 后,Trizol 试剂裂解细胞,提取各组细胞的总 RNA,使用反转录试剂盒得到 cDNA。反转录反应采用 PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa 公司)。反转录体系为 30 μL ,以 1.5 μg 总 RNA 为起始材料,5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix 6 μL ,无 RNA 酶水补足。反转录条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 反应体系:SYBR Premix ExTaq II (Til RNaseH Plus) 10 μL ,模板 cDNA 1.5 μL ,正反引物各 0.5 μL ,dd H₂O 7.5 μL 。实时荧光定量 PCR 检测 Runx2 mRNA 的表达量。Runx2 的引物序列:正向:5'-GGGAAGGGTGGGTAGTCATT-3',反向:5'-AGGCACAAAGAAGCCATACG-3',扩增片段长度为 153 bp;内参基因采用 β -actin。正向:5'-TAGGCGGACTGTTACTGAGC-3',反向:5'-TGCTC-CAACCAACTGCTGTC-3',扩增片段长度 233 bp。每个样本设 3 个复孔。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸

45 s,共进行 40 个循环。从 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中导出阈值循环数(Ct),换算各基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

4.6 TGP 对 MC3T3-E1 细胞钙矿化结节形成的影响 待细胞生长至铺满 80%~90% 瓶底后,消化,以 2×10^5 个/L 的密度接种于 24 孔板,每孔加入培养液 600 μ L。待细胞铺满孔底后更换为含有 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL α -抗坏血酸和 10% FBS 的诱导性培养基,实验组再分别加入 3、10 μ g/L 的 TGP,对照组不加药物,每组设置 4 个复孔。每 3 天更换对应的诱导性培养液。连续培养 30 天后弃掉培养基,PBS 洗涤 3 次,10% 甲醛固定 10 min,蒸馏水洗涤 3 次,每孔加入 500 μ L 的 0.1% 茜素红染液于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,再用蒸馏水洗涤 3 次,与 PBS 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,镜下观察并拍照。

4.7 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响(表 1) 与对照组比较,3 μ g/L TGP 组作用于细胞 24、48、72 h 后,均能促进成骨细胞的增殖($P<0.05$, $P<0.01$);10 μ g/L TGP 组作用于细胞 24 h 后,其增殖作用并不明显,但该浓度作用于细胞 48、72 h 后,亦能促进 MC3T3-E1 细胞的增殖($P<0.05$)。

表 1 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	细胞活力(OD 值)		
		24 h	48 h	72 h
对照	6	0.194 $\pm$ 0.031	0.358 $\pm$ 0.028	0.504 $\pm$ 0.030
3 μ g/L TGP	6	0.279 $\pm$ 0.019 **	0.421 $\pm$ 0.022 *	0.538 $\pm$ 0.011 *
10 μ g/L TGP	6	0.214 $\pm$ 0.045	0.385 $\pm$ 0.026 *	0.565 $\pm$ 0.022 *

注:与对照组同期比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞周期的影响(表 2) TGP 作用 48 h 后,与对照组比较,3 μ g/L TGP 组对细胞周期影响不明显;10 μ g/L TGP 组细胞处于 G1 期比例减少,而处于 S+G2 期比例增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞周期的影响 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	n	G1	S+G2
对照	3	0.832 $\pm$ 0.017	0.168 $\pm$ 0.017
3 μ g/L TGP	3	0.819 $\pm$ 0.012	0.181 $\pm$ 0.012
10 μ g/L TGP	3	0.775 $\pm$ 0.022 *	0.225 $\pm$ 0.022 *

注:与对照组同期比较,* $P<0.05$

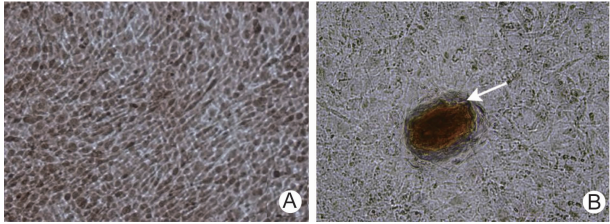
3 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性及 Runx2 mRNA 表达水平的影响(表 3) 与对照组比较,不同浓度 TGP 作用于 48 h 后即可促进成骨细胞 ALP 活性明显提高($P<0.01$);Runx2 mRNA 的表达水平亦明显提高($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 3 不同浓度 TGP 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性及 Runx2 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	ALP 活性(U/g·pro)	Runx2 mRNA
对照	5.465 $\pm$ 0.273(4)	1.000 $\pm$ 0.000(3)
3 μ g/L TGP	7.121 $\pm$ 0.536(4) **	1.958 $\pm$ 0.139(3) *
10 μ g/L TGP	9.071 $\pm$ 0.280(4) **	2.917 $\pm$ 0.673(3) **

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;()内数据为样本量

4 10 μ g/L TGP 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响(图 1) 与对照组比较,10 μ g/L TGP 组可显著刺激细胞矿化结节的形成。



注:A 为对照组;B 为 10 μ g/L TGP 组;图中箭头处表示形成的矿化结节

图 1 10 μ g/L TGP 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响 (茜素红染色, $\times 100$)

讨 论

慢性炎症激发持续炎症反应,释放大量炎症因子,破坏骨吸收和骨形成之间的耦联,骨的重吸收过程增强,导致骨量流失。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)通过多信号通路对骨代谢进行调节。TNF- α 对成骨细胞的作用包括^[6-8]:与细胞表面的 Fas/FasL 蛋白结合后引发成骨细胞凋亡;刺激成骨细胞分泌核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand,RANKL),激活 RANKL-RANK 信号诱导破骨细胞分化;抑制 Runx-2/Cbfa-1 和成骨相关转录因子(osterix,OSX)表达,抑制成骨细胞分化。TNF- α 可上调糖蛋白(dickkop, DKK-1)表达抑制 Wnt 信号,升高 RANKL/骨保护素(osteoprotegerin,OPG)比例,增强破骨细胞分化,加速骨吸收^[9]。肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor-related factor 6,TRAF6)近年来在骨代谢及骨免疫中起

重要调节作用的接头蛋白,通过 RANKL /RANK 介导破骨细胞分化与成熟^[10]。Shaw AT 等^[11]通过对 IL-17A 缺陷小鼠骨代谢研究发现,IL-17 可以负性调节 Wnt 信号通路,并诱导分泌性的 frizzled 相关蛋白 1 (secreted frizzled-related protein 1, sFRP1) 和分泌性的 frizzled 相关蛋白 3 (secreted frizzled-related protein 3, sFRP3) 表达,抑制炎症局部成骨细胞分化,减少骨形成。

TGP 作为一种免疫调节剂,临床上用于类风湿关节炎等自身免疫性疾病的治疗,其抗炎作用在大量临床基础研究中得到了证实^[12]。TGP 对炎症环境下的骨代谢也具有调节作用。贾敏等^[13,14]通过体外试验发现,小剂量的 TGP 可增强成骨细胞活性,且可抑制破骨细胞存活;动物试验中,TGP 可通过抑制 T 细胞表达 RANKL,从而抑制破骨细胞的分化,减少炎症骨丢失。周玲玲等^[15]研究证明,TGP 经丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs) 信号途径负性调节类风湿关节炎破骨细胞的分化和活性。通过观察 TGP 干预的关节炎兔模型^[16],TGP 通过调节 OPG 和 RANKL mRNA 表达水平,下调 RANKL/OPG 的比例,维持炎症区域的骨密度。在核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 介导下,TGP 能够促进人骨关节炎软骨细胞增殖并抑制凋亡^[17]。这些研究中,缺乏 TGP 对成骨细胞介导骨形成作用的直接证据。

本实验从增殖、分化和矿化 3 个方面,全面评价了 TGP 对成骨细胞的作用。实验结果表明,3 μ g/L TGP 组作用于细胞 24、48、72 h 均可促进细胞增殖。10 μ g/L TGP 组不仅促增殖,还可加速细胞从 G1 期向 S 和 G2 期转化。TGP 作用于诱导分化的 MC3T3-E1 细胞 48 h 后,细胞中 ALP 活性增强,Runx2 mRNA 表达水平升高。诱导分化 30 天后,TGP 组的矿化结节数量及面积明显高于对照组。这些结果证实了 TGP 具有直接促进 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化的能力,进一步完善了 TGP 调节骨代谢的药理机制,即除通过抗炎、调节免疫降低骨吸收之外,还有直接促进成骨的作用,为炎症相关骨质疏松的治疗策略提供实验依据和治疗思路。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 夏婷,李双庆.炎症相关骨质疏松症的发病机制[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(1):117-120.
- [2] 张扬,顾菲,汪悦.白芍总苷辅助治疗系统性硬化症的临床观察[J].中国中西医结合杂志,2017,37(7):

785-788.

- [3] Cai YS, Yuan QL, Xu K, et al. Assessment of the therapeutic effect of total glucosides of peony for juvenile idiopathic arthritis: A systematic review and Meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016; 8292486.
- [4] 郑红霞,章伟明,王圳,等.雷公藤多苷、白芍总苷联合柳氮磺胺吡啶诱导缓解并维持性治疗强直性脊柱炎的临床观察[J].中国中西医结合杂志,2018,38(6):651-654.
- [5] 余文景,许静,梁翼,等.桂皮醛及白芍总苷对骨关节炎滑膜炎性反应的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(8):3356-3360.
- [6] Yusoon K, Mikihiro H, Takehiro O, et al. Suppression of hematopoietic cell kinase ameliorates the bone destruction associated with inflammation [J]. Mod Rheumatol, 2018; 1553266.
- [7] 高诗雪,杨德圣.成骨细胞介导的炎症性骨改建的研究进展[J].中国急救复苏与灾害医学杂志,2016,11(9):937-939.
- [8] 常文静,蔡佳宇,蔡辉.细胞因子网络介导炎症自身免疫疾病骨丢失的研究进展[J].安徽医药,2016,20(3):409-412.
- [9] 褚赞波,邹荣鑫,黄海燕,等.破骨细胞功能调控与骨吸收抑制剂[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2018,11(5):509-514.
- [10] 张群燕,郭郡浩,蔡辉.肿瘤坏死因子受体相关因子 6 与骨代谢的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(2):272-276.
- [11] Shaw AT, Maeda Y, Gravallesse EM. IL-17A deficiency promotes periosteal bone formation in a model of inflammatory arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18(1): 104.
- [12] 余欣然,曹峰,陈云志.白芍总苷在自身免疫性疾病中的运用进展[J].中医药学报,2019,47(1):127-130.
- [13] 贾敏,张寒.白芍总苷对体外培养的成骨细胞和破骨细胞的影响[J].西北药学杂志,2010,25(5):357-359.
- [14] 贾敏,张寒,杨颖,等.白芍总苷对关节炎大鼠骨质破坏及 T 细胞表达 RANKL 的影响[J].中药药理与临床,2012,28(6):62-65.
- [15] 周玲玲,魏伟,柳璋璞,等.白芍总苷对共培养诱导的破骨细胞的作用及机制[J].中国药理学通报,2014,30(11):1547-1551.
- [16] Chen CW, Fan TY, Li YM, et al. Total glucosides of paeony prevents juxta-articular bone loss in experimental arthritis [J]. BMC Complement Alternat Med, 2013, 13: 186.
- [17] 杜旭召,杨豪,邓素玲,等.白芍总苷对骨关节炎软骨细胞增殖及分泌表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(11):1375-1379,1385.

(收稿:2019-01-14 在线:2019-10-12)

责任编辑:段碧芳

英文责编:张晶晶