

· 基础研究 ·

牛膝甾酮对小鼠 MC3T3-E1 细胞
成骨分化和增殖的影响姜 涛¹ 凌翠敏² 黄永青¹ 陈庆真¹ 杨冰璇¹ 邵 敏¹

摘要 目的 研究牛膝甾酮(IS)对小鼠成骨细胞系(MC3T3-E1 细胞)增殖、分化的影响及其可能的分子机制。方法 将 MC3T3-E1 细胞分为对照组及 IS 不同浓度组(10^{-4} ~ 10^{-1} ng/ μ L), 24、48 h 后采用细胞计数(CCK8)试剂盒检测细胞增殖, 7、14 天后采用碱性磷酸酶(ALP)活性试剂盒检测 ALP 活性, 茜素红染色检测矿化结节, 原位末端标记(TUNEL)试剂盒检测细胞凋亡情况, 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测成骨分化相关标志物 I 型胶原(Collagen I)、骨保护素(OPG)、骨桥蛋白(OPN)、骨钙素(OCN)、ALP 以及雌激素受体 alpha($ER\alpha$)、雌激素受体 beta($ER\beta$) mRNA 的表达水平。结果 与对照组比较, 在干预 48 h 后, 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L IS 能抑制细胞的增殖($P<0.05$), 但对细胞凋亡无明显影响。 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L IS 均能够促进 ALP 活性及矿化结节的形成($P<0.05$), 亦能促进 $ER\alpha$ 、OPG、Collagen I、ALP mRNA 表达($P<0.05$); 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L IS 均能促进 OPN、OCN mRNA 表达($P<0.05$), 10^{-1} ng/ μ L IS 能够促进 $ER\beta$ mRNA 表达($P<0.05$)。结论 IS 能促进 MC3T3-E1 细胞的成骨分化, 其可能机制与上调成骨分化标志物及提高 $ER\alpha$ mRNA 表达有关。

关键词 牛膝甾酮; 成骨分化; 细胞增殖; 骨质疏松症

Effects of Inokosterone on Osteogenic Differentiation and Proliferation of MC3T3-E1 Cells JIANG Tao¹, LING Cui-min², HUANG Yong-qing¹, CHEN Qing-zhen¹, YANG Bing-xuan¹, and SHAO Min¹
1 Third Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Department of Acupuncture, Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou (510095)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects and possible molecular mechanism of inokosterone (IS) on proliferation and osteogenic differentiation of mouse MC3T3-E1 osteoblastic cells. **Methods** Cells were divided into the control group and IS groups of different concentrations (10^{-4} – 10^{-1} ng/ μ L). After 24 and 48 h cell counting kit-8 assay (CCK8) was performed to evaluate the proliferation of cells. At day 7 and 14 alkaline phosphatase (ALP) activity was detected using ALP activity kit. Mineralized nodules were observed by alizarin red staining. Cell apoptosis were determined by TDT-mediated dutp nick end labeling (TUNEL) method. mRNA expression levels of osteogenic genes [collagen type I (Collagen I), osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), alkaline phosphatase (ALP), estrogen receptor alpha ($ER\alpha$), and estrogen receptor beta ($ER\beta$)] were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** The proliferation of cells was inhibited by 10^{-3} , 10^{-2} , and 10^{-1} ng/ μ L IS treatment after 48 h intervention, as compared with the control group ($P<0.05$), but with no obvious effect on cell apoptosis. ALP activity and the formation of mineralized nodules were significantly promoted by 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , and 10^{-1} ng/ μ L IS treatment ($P<0.05$). 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , and 10^{-1} ng/ μ L IS treatment

基金项目: 广州市科技计划项目 (No. 201707010463); 国家自然科学基金面上项目 (No. 81373654); 广东省自然科学基金项目 (No. 2015A030313351)

作者单位: 1. 广州中医药大学第三临床医学院 (广州 510405); 2. 广东省第二中医院针灸科 (广州 510095)

通讯作者: 邵 敏, Tel: 020-84238774, E-mail: shaomin98@aliyun.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20200430. 308

promoted mRNA expressions of $ER\alpha$, OPG, Collagen I, and ALP ($P<0.05$). 10^{-3} , 10^{-2} , and 10^{-1} ng/ μ L IS treatment promoted mRNA expressions of OPN and OCN ($P<0.05$). 10^{-1} ng/ μ L IS treatment promoted mRNA expression of $ER\beta$ ($P<0.05$). **Conclusion** IS promoted osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells possibly by up-regulating the expressions of osteogenic differentiation markers and elevating $ER\alpha$ expression.

KEYWORDS inokosterone; osteogenic differentiation; cell proliferation; osteoporosis

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 以骨的微观结构退变及骨量减少为特征, 发病过程中, 由于骨的强度下降、脆性增加而易发生骨折^[1], 与此相关的医疗花费是社会及个人沉重的经济负担^[2]。小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞是研究成骨细胞增殖和分化最常用的细胞模型之一^[3]。本课题组前期的研究发现, 与六味地黄丸比较, 金匱肾气丸更能促进原代成骨细胞的增殖、分化, 并且能够显著提高去势 SD 大鼠的骨量, 通过成分分析, 发现相对于六味地黄丸, 金匱肾气丸多了牛膝、车前子、附子 3 味药物, 其中牛膝为补肝肾、强筋骨之要药, 因此课题组认为牛膝是导致六味地黄丸与金匱肾气丸成骨效能差异的主要原因之一, 进一步通过高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 从牛膝中提取出活性成分“牛膝甾酮 (inokosterone, IS)”^[4]。而 IS 对成骨细胞的增殖、分化存在何种影响, 目前国内外尚无研究报道, 故本实验中, 旨在探讨不同浓度 (10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L) IS 对 MC3T3-E1 细胞增殖及分化的影响及其可能的作用机制。

材料与方法

1 细胞株 成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞 (购自武汉 Procell, 货号: CL-0378)。

2 药物 IS (每支 5 mg, 纯度 $\geq 98\%$, 购于南京森贝伽生物科技有限公司, 货号: 15130-85-5), 可溶于 α -最低基本培养基 (α -minimum essential medium, α -MEM), 根据摩尔浓度计算器, 将 0.5 mg 的 IS 用 50 mL α -MEM 配制成 10 ng/ μ L 的母液, 使用前将母液按照 100 倍稀释至 10^{-1} ng/ μ L, 以此类推得到 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ng/ μ L IS。

3 主要试剂及仪器 α -MEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青链霉素、0.25% 胰蛋白酶 (美国 GIBCO 公司); β -甘油磷酸钠、抗坏血酸、地塞米松 (美国 Sigma 公司); 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒 (南京建成生物公司); 茜素红染色液、细胞计数 (cell

counting kit-8, CCK8) 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 原位末端标记 (TDT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司); 细胞 RNA 快速提取试剂盒、两步法荧光定量反转录 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 细胞超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 移液器 (德国 Eppendorf 公司); 倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司); 细胞培养箱、全自动酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

4 方法

4.1 细胞培养 将 MC3T3-E1 细胞用含 10% 血清、1% 青链霉素的 α -MEM 培养基培养, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱中, 每天在显微镜下观察细胞的生长状态, 当细胞融合率达到 80% ~ 90% 时, 用 0.25% 的胰酶消化传代。

4.2 CCK8 检测不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 (1) 消化 P3 代细胞以 3×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板, 细胞分 6 组: 空白对照组 (不含细胞的调零组), 阴性对照 (negative control, NC) 组 (不加药组), 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L IS 组, 每组设置 6 个复孔; (2) 接种 24 h 待细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 加入含药的培养基, 干预 24、48 h; (3) 药物干预 24、48 h 后, 将 CCK8 溶液与培养基按照 1:9 的比例混匀, 然后每孔弃去旧培养基, 加入 100 μ L 混匀好的 CCK8 溶液; (4) 将 96 孔板在培养箱内避光孵育 2 h 后用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。计算细胞活力。细胞活力 (%) = $[OD(IS) - OD(空白)] / [OD(NC) - OD(空白)] \times 100\%$ 。

4.3 TUNEL 试剂盒检测不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响 (1) 消化 P3 代细胞, 然后按照 10^5 个/孔的密度接种到 3.5 cm 培养皿上, 细胞分为 5 组: 对照组, 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L IS 组, 在细胞培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后, 弃去原有培养基, 加入含药或不含药的新鲜成骨诱导培养基 (10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ mol/L 抗坏血酸、 10^{-8} mol/L 地塞米松), 每 2 天换液 1 次; (2) 细胞培养至第 7、14 天时用 PBS 缓冲液冲洗 2 次并重悬, 制成

细胞爬片,自然晾干;(3)用 4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min, PBS 漂洗 2 次,每次 5 min;(4)按照 TUNEL 试剂盒说明书进行操作及染色;(5)显微镜下观察凋亡细胞的染色情况。

4.4 ALP 活性试剂盒检测不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响 (1)消化 P4 代细胞,以 5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板,细胞分组同 4.3,在培养箱中培养 24 h;(2)24 h 待细胞贴壁后,弃去孔内旧培养基,加入含药或不含药的新鲜成骨诱导培养基,每 2 天换液 1 次;(3)培养 7、14 天后弃去培养液,使用裂解液裂解细胞后按照 ALP 活性试剂盒的说明进行操作,计算金氏单位(U/mg),用金氏单位反映 ALP 活性。

4.5 茜素红染色检测 MC3T3-E1 细胞矿化结节 (1)消化 P4 代细胞,以 1×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板,细胞分组及培养方法同 4.3;(2)培养 7、14 天后弃去培养液,用 PBS 清洗 3 遍,每次 5 min,使用 4% 的多聚甲醛固定 30 min 后弃去多聚甲醛, PBS 清洗 3 遍,每孔加入 300 μ L (覆盖细胞)茜素红染色液,室温下染色 10 min, PBS 清洗 3 遍;显微镜下观察 MC3T3-E1 细胞矿化结节的形成情况。

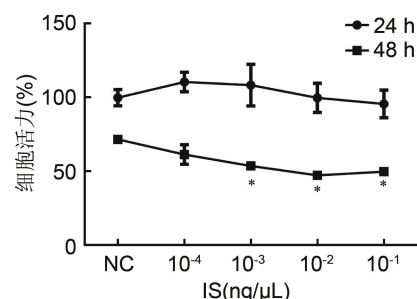
4.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) (1)消化 P4 代细胞,以 10^8 个/孔的密度接种于 6 孔板,细胞分组及培养方法同 4.3;(2)24 h 待细胞贴壁后,弃去孔内旧培养基,加入含药或不含药的新鲜成骨诱导培养基,每 2 天换液 1 次;(3)培养 7 天后,弃去培养液,用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度,每组取 1.0 μ g 总 RNA,分别加入反转录试剂盒的反应体系,在反转录仪中进行反转录生成 cDNA 后,RT-qPCR 测定雌激素受体 alpha (estrogen receptor alpha, ER α)、雌激素受体 beta (estrogen receptor beta, ER β)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、I 型胶原 (collagen type I, Collagen I)、ALP mRNA 的表达情况: ER α 的引物序列:正向:5'-CGCCGTGT-TCAACTAC-3',反向:5'-AAGCCCCCAGACTATT-3',扩增长度 107 bp; ER β 的引物序列:正向:5'-TGCTGTGATGAACTACAGT-3',反向:5'-GCAT-AGAGGAGCGATG-3',扩增长度 114 bp; OCN 的引物序列:正向:5'-TGACTGCATTCTGCCTCTC-3',反向:5'-CGGAGTCTATTACACCTTAC-3',扩增长度 101 bp; OPN 的引物序列:正向:5'-CAGCCAAG-

GACCAACTACAA-3',反向:5'-TGCCAAACTCAGC-CACTT-3',扩增长度 101 bp; OPG 的引物序列:正向:5'-ACTTGGCCTCCTGCTAATTC-3',反向:5'-CGCA-CAGGGTGACATCTATT-3',扩增长度 105 bp; Collagen I 的引物序列:正向:5'-CATGAGCCGAAGCTAAC-CC-3',反向:5'-CTCCTATGACTTCTGCGTCTGG-3',扩增长度 113 bp; ALP 的引物序列:正向:5'-GC-CCTCTCCAAGACATATA-3',反向:5'-CCATGAT-CACGTCGATATCC-3',扩增长度 114 bp; β -actin 的引物序列:正向:5'-ATATCGCTGCGCTGGTCGTC-3',反向:5'-AGGATGGCGTGAGGGAGAGC-3',扩增长度 126 bp。每个基因设 3 个复孔,PCR 仪反应条件设置为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,共进行 40 个循环,从 PCR 仪中导出 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法并以 β -actin 为内参计算上述指标的相对表达量。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,若数据呈正态分布,方差齐,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 (图 1) 干预 24 h 后,与 NC 组同期比较, 10^{-4} 、 10^{-3} ng/ μ L IS 组细胞活力提高,而随着浓度的增高, 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L IS 组细胞活力降低,但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);干预 48 h 后, 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} ng/ μ L IS 组细胞活力降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注:与 NC 组同期比较,* $P < 0.05$

图 1 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

2 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响 (表 1) 与对照组同期比较,经 IS 干预 7、14 天后,不同浓度 IS 均能够显著提高 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性,并呈现一定的浓度依赖性 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALP (U/mg)	
		7 天	14 天
对照	3	3.543±0.769	3.000±0.366
10 ⁻⁴ ng/μL IS	3	7.317±1.010 *	12.570±0.500 *
10 ⁻³ ng/μL IS	3	8.513±1.038 *	14.150±0.166 *
10 ⁻² ng/μL IS	3	14.930±0.962 *	16.850±2.128 *
10 ⁻¹ ng/μL IS	3	20.820±2.050 *	27.210±1.816 *

注:与对照组同期比较, * P<0.05

3 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响(图 2,表 2) 与对照组同期比较,不同浓度的 IS 能够促进矿化结节的形成,干预 7 天后,10⁻³、10⁻²、10⁻¹ng/μL IS 组差异有统计学意义(P<0.05),干预 14 天后,10⁻⁴、10⁻³、10⁻²、10⁻¹ng/μL IS 组差异均有统计学意义(P<0.05)。

4 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响(图 3) TUNEL 染色结果的判定标准为:细胞核中出现棕黄色颗粒为凋亡细胞。不同浓度 IS 干预 MC3T3-E1 细胞 7、14 天,与对照组同期比较,不同浓度 IS 对细胞凋亡无明显影响。

表 2 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

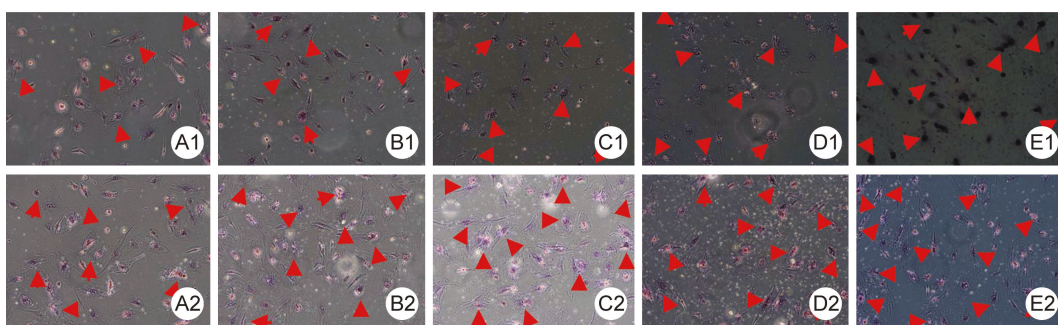
组别	n	OD 值	
		7 天	14 天
对照	3	119.300±2.241	127.200±1.941
10 ⁻⁴ ng/μL IS	3	127.200±4.480	146.500±1.361 *
10 ⁻³ ng/μL IS	3	164.200±3.096 *	142.400±1.164 *
10 ⁻² ng/μL IS	3	170.600±6.598 *	156.700±1.201 *
10 ⁻¹ ng/μL IS	3	153.600±5.351 *	158.700±0.389 *

注:与对照组同期比较, * P<0.05

5 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞 ERα、ERβ、ALP、Collagen I、OCN、OPG、OPN mRNA 表达水平的影响(表 3) IS 干预 7 天后,与对照组比较,10⁻⁴、10⁻³、10⁻²、10⁻¹ng/μL IS 组可促进 ERα、ALP、Collagen I、OPG mRNA 表达(P<0.05),10⁻³、10⁻²、10⁻¹ng/μL IS 组可促进 OCN、OPN mRNA 表达(P<0.05),10⁻¹ng/μL IS 组促进 ERβ mRNA 表达(P<0.05)。

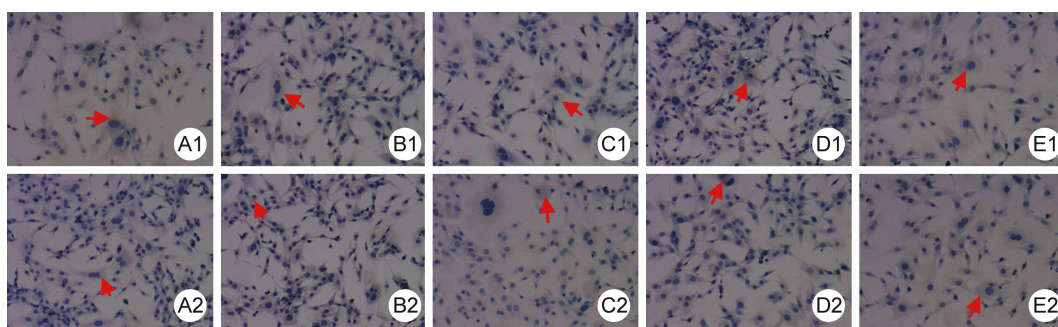
讨 论

人体的骨骼终其一生都在进行骨重塑,骨重塑包括成骨细胞主导的骨形成以及破骨细胞主导的骨吸收



注:A 为对照组;B 为 10⁻⁴ng/μL IS 组;C 为 10⁻³ng/μL IS 组;D 为 10⁻²ng/μL IS 组;E 为 10⁻¹ng/μL IS 组;其中 1,2 分别代表 7,14 天;图中箭头表示矿化结构

图 2 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响 (茜素红染色, ×100)



注:A 为对照组;B 为 10⁻⁴ng/μL IS 组;C 为 10⁻³ng/μL IS 组;D 为 10⁻²ng/μL IS 组;E 为 10⁻¹ng/μL IS 组;其中 1,2 分别代表 7,14 天;图中箭头表示凋亡细胞

图 3 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, ×100)

表 3 不同浓度 IS 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化标志物表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mRNA						
		ER α	ER β	ALP	Collagen I	OCN	OPG	OPN
对照	3	0.900 $\pm$ 0.055	0.673 $\pm$ 0.032	1.020 $\pm$ 0.230	0.446 $\pm$ 0.032	0.593 $\pm$ 0.051	0.576 $\pm$ 0.037	0.933 $\pm$ 0.070
10 ⁻⁴ ng/ μ L IS	3	1.363 $\pm$ 0.130 *	0.683 $\pm$ 0.040	4.600 $\pm$ 1.670 *	0.683 $\pm$ 0.128 *	0.616 $\pm$ 0.020	0.680 $\pm$ 0.036 *	0.987 $\pm$ 0.035
10 ⁻³ ng/ μ L IS	3	1.527 $\pm$ 0.068 *	0.663 $\pm$ 0.051	5.157 $\pm$ 1.380 *	0.603 $\pm$ 0.055 *	0.816 $\pm$ 0.035 *	0.716 $\pm$ 0.035 *	1.633 $\pm$ 0.142 *
10 ⁻² ng/ μ L IS	3	1.110 $\pm$ 0.098 *	0.713 $\pm$ 0.035	5.230 $\pm$ 0.420 *	0.623 $\pm$ 0.102 *	0.843 $\pm$ 0.055 *	0.913 $\pm$ 0.030 *	1.570 $\pm$ 0.080 *
10 ⁻¹ ng/ μ L IS	3	1.153 $\pm$ 0.105 *	0.777 $\pm$ 0.037 *	9.200 $\pm$ 1.550 *	0.550 $\pm$ 0.043 *	1.073 $\pm$ 0.092 *	0.883 $\pm$ 0.040 *	1.097 $\pm$ 0.028 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

两个过程^[1,5,6],生理情况下此过程保持动态平衡,随着增龄、激素水平改变、药物的使用等因素的影响,该平衡被打破导致一些代谢性骨病的发生,包括 OP^[7]。目前,临床上用于治疗 OP 的药物大多以抑制破骨细胞的活性以及骨吸收为主^[8],然而长期的抑制骨吸收可能使破骨细胞处于“无应答”的状态^[9],降低药物的疗效,因此提高成骨细胞的活性以及促进骨形成是更加理想的方法^[10]。

近年来,越来越多的基础研究把目光转向成骨细胞,为 OP 的临床治疗提供了新的思路 and 理想靶点^[11-14]。中药复方及活性成分调控成骨细胞功能的基础研究亦日益增多,魏秋实等^[15]发现淫羊藿苷能够促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向成骨细胞分化,其潜在机制与调控 ER α -Wnt/ β -catenin 信号通路相关;沉默信息调节因子 2 相关酶 1(sirtuin1, Sirt1)是骨形成的正向调控蛋白^[16],能够正向调节成骨细胞的功能,而白藜芦醇是 Sirt1 的激动剂,Ornstrup MJ 等^[17]发现相对于安慰剂,经白藜芦醇口服治疗 16 周后能够显著提高患者腰椎的骨密度以及骨 ALP 的水平,提示白藜芦醇能够显著促进人的骨形成,除此之外,亦有关于二仙汤、莲心碱、地黄苷等的研究报道^[18-20]。

本课题组前期的研究表明^[4],与六味地黄丸比较,金匱肾气丸的成骨效能更优,通过成分分析初步认为牛膝在其中发挥关键作用,进一步从牛膝中分离出活性成分 IS,通过 CCK8 法发现,IS 一定程度上可抑制成骨细胞的增殖。

细胞凋亡是指为维持内环境的稳定,由基因控制的细胞自主的、有序的死亡,在 OP 发病过程中,成骨细胞的凋亡增加导致骨形成显著减少,因此抑制成骨细胞的凋亡有助于促进骨形成,本实验通过 TUNEL 检测发现,IS 在一定程度上抑制细胞增殖,但不会增加成骨细胞的凋亡。在不同浓度 IS 对成骨分化影响的实验过程中发现,成骨诱导 7、14 天后,IS 呈剂量依赖的方式增加 ALP 活性,类似的结果见于茜素红染

色,提示 IS 能够促进成骨分化。IS 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化标志物 ALP、OPN、OCN、OPG、Collagen I mRNA 的影响说明 IS 能够通过上调成骨分化相关标志物而促进成骨分化。近年来,植物雌激素(phytoestrogen, PE)作为一种存在于天然植物中却发挥雌激素效应的化合物,备受学者重视,这些化合物能够与雌激素受体 ER α 、ER β 结合发挥类雌激素效应,具有调节成骨细胞和破骨细胞活性及治疗 OP 的作用^[21]。课题组前期研究发现,牛膝提取物蜕皮甾酮能够显著上调原代成骨细胞 ER α mRNA 的表达,发挥植物雌激素的作用^[22],提示 IS 可能是一种潜在的植物雌激素。

故本实验发现,不同浓度 IS 能在一定程度上抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖,明显促进 MC3T3-E1 细胞早期分化和晚期矿化能力,其机制可能与上调 ER α 及成骨分化标志物 mRNA 表达相关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Ensrud KE, Crandall CJ. Osteoporosis[J]. Ann Intern Med, 2017, 167(3): ltc17-ltc32.
- [2] Tu KN, Lie JD, Wan CKV, et al. Osteoporosis: A review of treatment options[J]. Pharmacy Therapeutics, 2018, 43(2): 92-104.
- [3] Sudo H, Kodama HA, 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.
- [4] 徐绍俊, 黄建烽, 邵敏, 等. 补肾方剂对绝经后骨质疏松症大鼠的影响及其作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 588-593.
- [5] Watts NB. Postmenopausal osteoporosis: A clinical review[J]. J Women's Health, 2018, 27(9): 1093-1096.
- [6] Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis[J]. Lancet Dia-

- betes Endocrinol, 2017, 5(11): 908–923.
- [7] Kling JM, Clarke BL, Sandhu NP. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review [J]. J Women's Health, 2014, 23(7): 563–572.
- [8] Yavropoulou MP, Papapoulos SE. Targeting the Wnt signaling pathway for the development of novel therapies for osteoporosis [J]. Expert Rev Endocrinol Metab, 2010, 5(5): 711–722.
- [9] Shaarawy M, Hasan M. Serum bone sialoprotein: a marker of bone resorption in postmenopausal osteoporosis [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2001, 61(7): 513–521.
- [10] Zhang F, Xie J, Wang G, et al. Anti-osteoporosis activity of Sanguinarine in preosteoblast MC3T3-E1 cells and an ovariectomized rat model [J]. J Cell Physiol, 2017, 233(6): 4626–4633.
- [11] Zhang J, Zhang W, Dai J, et al. Overexpression of Dlx2 enhances osteogenic differentiation of BMSCs and MC3T3-E1 cells via direct upregulation of osteocalcin and Alp [J]. Int J Oral Sci, 2019, 11(2): 119–130.
- [12] Yu SB, Kim HJ, Kang HM, et al. Cordycepin accelerates osteoblast mineralization and attenuates osteoclast differentiation *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018(1): 1–10.
- [13] Sasa K, Yoshimura K, Yamada A, et al. Monocarboxylate transporter-1 promotes osteoblast differentiation via suppression of p53, a negative regulator of osteoblast differentiation [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10579.
- [14] Pan BL, Tong ZW, Li SD, et al. Decreased microRNA-182-5p helps alendronate promote osteoblast proliferation and differentiation in osteoporosis via the Rap1/MAPK pathway [J]. Biosci Rep, 2018, 38(6): 1–16.
- [15] Wei Q, Zhang J, Hong G, et al. Icariin promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by activating the ERalpha-Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 931–939.
- [16] Zainabadi K, Liu CJ, Caldwell ALM, et al. SIRT1 is a positive regulator of *in vivo* bone mass and a therapeutic target for osteoporosis [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185236.
- [17] Ornstrup MJ, Harsløf T, Kjøer TN, et al. Resveratrol increases bone mineral density and bone alkaline phosphatase in obese men: a randomized placebo-controlled trial [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(12): 4720–4729.
- [18] Chen S, Chu B, Chen Y, et al. Neferine suppresses osteoclast differentiation through suppressing NF-kappaB signal pathway but not MAPKs and promote osteogenesis [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 22960–22971.
- [19] Wang N, Xin H, Xu P, et al. Erxian Decoction attenuates TNF-alpha induced osteoblast apoptosis by modulating the Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 988.
- [20] Zhou X, Liu Z, Huang B, et al. Orcinol glucoside facilitates the shift of MSC fate to osteoblast and prevents adipogenesis via Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 2703–2713.
- [21] 王琦, 李长兴, 代冬芳. 植物雌激素防治绝经后骨质疏松症的研究进展 [J]. 河南医学研究, 2020, 29(5): 960–962.
- [22] Xu S, Shao M, Wang Q, et al. Ecdysterone promotes osteoblast differentiation through ERα mediated AMPKα signal inhibition and β-catenin signal activation [J]. Nanosci Nanotechnol, 2017, 9(9): 1419–1426.

(收稿: 2019-11-15 在线: 2020-06-11)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶