

刺老苞根皮水提物对成骨细胞 TGF- β /BMPs 信号通路的影响

燕梦云, 依香叫, 李金诚, 王松月, 周文斌, 裴凌鹏*

中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081

摘要: 目的 研究刺老苞根皮水提物对成骨细胞 TGF- β /BMPs 信号通路的影响。方法 建立大鼠骨折模型, 随机分为模型组, 刺老苞根皮水提物低、中、高剂量 (3.6、1.8、0.9 g/kg) 组, ig 给药 7 d 后腹主动脉取血, 分离血清; 培养大鼠原代成骨细胞, 经碱性磷酸酶染色、茜素红染色鉴定合格后, 分别以对应组别的动物血清连续培养 48 h, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blotting 技术分别检测各组细胞中骨形态发生蛋白质-2 (BMP-2)、转化生长因子- β (TGF- β)、Smad 家族相关蛋白 1、2 (Smad-1、Smad-2) mRNA 和蛋白表达。结果 与模型组比较, 刺老苞根皮水提物不同浓度的含药血清组 BMP-2、TGF- β 、Smad-1 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 中、高剂量含药血清组 Smad-2 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$); 低、中、高剂量含药血清组的 BMP-2、TGF- β 、Smad-1、Smad-2 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。结论 刺老苞根皮水提物通过上调 TGF- β /BMPs 信号传导通路中的 BMP-2、TGF- β 、Smad-1、Smad-2 表达, 促进成骨细胞增殖。

关键词: 刺老苞根皮; 水提物; 成骨细胞; TGF- β /BMPs 信号通路

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)11-1541-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.11.004

Effect of aqueous extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* containing serum on TGF- β /BMPs signaling pathway in primary osteoblasts

YAN Meng-yun, YI Xiang-jiao, LI Jin-cheng, WANG Song-yue, ZHOU Wen-bin, PEI Ling-peng

Institute of Minority Traditional Medicine Research, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective To study the effect of aqueous extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* (AEAE) on expression of TGF- β /BMPs signaling pathway in osteoblasts. **Methods** The fracture model of rat was established and randomly divided into model group, AEAE low, middle and high dose (3.6, 1.8, 0.9 g/kg) group. After ig administration for 7 d, the blood was taken from abdominal aorta and the serum was separated. The rats primary osteoblasts were cultured and qualified after alkaline phosphatase staining and alizarin red staining. The osteoblasts were cultured continuously for 48 h in animal serum of the corresponding group. The contents of BMP-2, TGF- β , Smad-1 and Smad-2 were detected by qRT-PCR and Western blotting method. **Results** Compared with model group, the mRNA level of BMP-2, TGF- β and Smad-1 in AEAE low, middle and high dose group, Smad-2 mRNA level in middle and high dose group, and the protein level of BMP-2, TGF- β , Smad-1 and Smad-2 in low, middle and high dose group were significantly higher than those in model group ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** AEAE can promote the proliferation of osteoblasts by up-regulating the expression of BMP-2, TGF- β , Smad-1 and Smad-2 in TGF- β /BMPs signaling pathway.

Key words: root bark of *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex*; aqueous extract; osteoblast; TGF- β /BMPs signaling pathway

刺老苞 *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex*, 小乔木, 高达 7 m, 小枝密生细长直刺, 刺长 7~14 mm; 分布于四川 (天全、石棉、黑水、奉节)、云南 (景东)、贵州 (梵净山)、广西 (灵川、资源)、广东 (连山、乐昌、英德)、福建 (建宁)、江西 (铅

山、萍乡、宜丰)、湖北 (巴东)、湖南 (永顺)、安徽 (黄山) 和浙江 (昌化、天目山), 生于森林中, 垂直分布海拔可达 2 600 m^[1]; 药材块片状或槽状, 气微香, 嚼之带黏液性, 味辛, 性平, 归肝、肾经, 功能滋阴健肾, 祛风湿, 壮筋骨, 散瘀血, 消肿毒,

收稿日期: 2017-07-07

基金项目: 国家自然科学基金 (81173361、81270051、81473451)

作者简介: 燕梦云 (1992-), 女, 籍贯: 湖北, 硕士研究生, 主要从事药物化学与药效学研究, E-mail: 13001129811@163.com Tel: 13001129811

*通信作者 裴凌鹏, 副教授, 主要从事民族医药与临床医学研究。E-mail: lpei@hotmail.com Tel: 13520801809

可用于风湿痹痛、跌打损伤、骨折、骨质疏松等的治疗^[2-3]。近年来,刺老苞治疗骨科疾病的研究逐渐增多,但关于其机制的报道很少。本实验建立大鼠骨折模型,取含药血清培养原代成骨细胞,通过将各给药组骨形态发生蛋白质-2 (BMP-2)、转化生长因子- β (TGF- β)、Smad 家族相关蛋白 1、2 (Smad-1、Smad-2) 的含量与模型组比较,研究刺老苞根皮对成骨细胞 TGF- β /BMPs 信号通路蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 药材及主要试剂

刺老苞根皮,购自湖北恩施医药公司,批号 OP1101,经北京中医药大学药系杨瑶珺教授鉴定为五加科木属植物棘茎楸木 *Aralia echinocaulis* Hand. Mazz, 药用部分为根皮。

α -MEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);青霉素/链霉素(美国 Sigma 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京赛诺博生物科技有限公司);HRP 标记的山羊抗兔 IgG (H+L)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L)、HRP 标记的牛抗山羊 IgG (H+L),均购自北京天德悦生物科技有限责任公司;GAPDH 鼠单抗(美国 Immunoway 公司);BMP-2、TGF- β 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Smad-1、Smad-2 抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 主要仪器

细胞超净操作台(苏州苏洁净化设备有限公司);CO₂ 培养箱、MultiSkan3 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);电脑型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);ABI 7900HT 荧光定量 PCR 仪(美国 KAPA Biosystems 公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器)。

1.3 实验动物

健康雌性 SD 大鼠 80 只,体质量(270 \pm 20)g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证编号 SCXK-(军)2012-0004。

2 方法

2.1 刺老苞含药血清制备

将刺老苞根皮生药加 10 倍水回流提取 2 次,提取液减压浓缩至 36 g 生药/100 mL,得刺老苞根皮水提取物(以三萜皂苷为主要成分,相对分子质量为 1 058~1 220,质量分数约为 6.71%),再分别配置为低、中、高浓度(0.09、0.18、0.36 g/mL)。

取健康雌性 SD 大鼠 80 只进行胫骨骨折造模,适应性喂养一周后,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg) ip 麻醉。将动物固定后,左下肢脱毛,皮肤消毒。无菌条件下,自胫骨结节下端起,沿胫骨走行,做纵行切口,长 1 cm。切开皮肤、皮下筋膜,剥开胫前肌,显露胫骨。在胫骨结节下端 2 mm 处,用镶嵌 1 mm 克氏针的打孔器自胫骨外侧向胫骨内侧打孔,直径为 1 mm,钻透皮质深达髓腔,但不触及对侧皮质。在该孔下沿胫骨纵轴方向依次再打 2 个孔,每两个孔的间距为 5 mm。用生理盐水彻底冲洗,滴 1~2 滴青霉素(80 万单位/mL),逐层缝合切口。术后 3 d 连续 sc 青霉素 8 万单位/只,预防感染。

动物分笼饲养,术后随机分为 4 组:模型组及刺老苞根皮水提取物高、中、低剂量(3.6、1.8、0.9 g/kg)组,每组 20 只,ig 给药,模型组按每只体质量给同频率蒸馏水,7 d 后腹主动脉取血,分离得到血清,均过滤除菌后分装保存于-20 °C 备用。

2.2 成骨细胞培养及鉴定

取 24 h SD 大鼠乳鼠解剖获得骨髓单核细胞,种植于 100 mm 培养皿中,在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养、传代。取第 3~6 代成骨细胞接种于 24 孔板中,接种密度为 1 \times 10⁵/孔,当细胞生长到完全融合的时候,加入成骨细胞分化培养基进行全换液,并以全换液时间节点为 0 d,分别取 4 d 的成骨细胞做碱性磷酸酶染色,10 d 的成骨细胞做茜素红染色,进行鉴定。收集第 3 代成骨细胞,将细胞计数后分成 4 个处理组:模型组及刺老苞根皮水低、中、高剂量组,分别以对应组别的动物血清连续培养 48 h。

2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 BMP-2、TGF- β 、Smad-1、Smad-2 的相对表达量

从培养的成骨细胞中提取 RNA,使用 TIANGEN 试剂盒操作合成 cDNA。使用 Primer-Blast 设计引物(表 1),退火温度 55~60 °C,片段长度 100~300 bp,由美吉生物公司合成。按照 PCR 反应条件:95 °C、30 s,95 °C、15 s,56 °C、20 s,72 °C、20 s,循环扩增 40 次。使用 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪进行定量,实验数据以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算,GAPDH 为内参基因。

2.4 Western blotting 检测 BMP-2、TGF- β 、Smad-1、Smad-2 的蛋白表达

使用预冷的 RIPA 蛋白抽提试剂,加入蛋白酶抑制剂、终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF,从培养的

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
GAPDH	5'-GCCCAGCAAGGATACTGAGA-3'	5'-GGTATTCGAGAGAAGGGAGGG-3'
BMP-2	5'-ATATGCTCGACCTGTACCGC-3'	5'-CCTCGATGGCTTCTTCGTGA-3'
TGF-β	5'-CTTTGGATGCCGCCTATTGC-3'	5'-CCCCAGCACAGAAGTTAGCA-3'
Smad-1	5'-GCCATGCGTAGTAACCTTTCTG-3'	5'-TGGGCTTTACGGCAATGTCT-3'
Smad-2	5'-CTCCAGTGTTAGTGCCTCGTC-3'	5'-TCAGGAAACGTGGCATTCTGG-3'

成骨细胞中提取蛋白质。收集细胞，加入 100 μL RIPA 抽提试剂，吹打混匀，冰上孵育 20 min，4 °C、13 000 r/min 离心 20 min。离心完成后取上清，分装保存，待测。BCA 法测定蛋白质浓度，调整蛋白浓度至 4 mg/mL。取适量蛋白样品在电泳槽中进行聚丙烯酰胺电泳，电转蛋白至 NC 膜，3% BSA-TBST 封闭 30 min，以 1 : 2 000 比例加入各蛋白一抗，4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 5 次后加入 HRP 标记的二抗 (1 : 10 000)，室温孵育后洗涤 6 次，ECL 法显影，定影，对印迹目的条带进行扫描。TotalLab Quant 软件分析图片中的条带灰度值。

2.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用 SPSS 20.0 软件进行分析，组间采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 成骨细胞的鉴定

经倒置显微镜观察 (图 1)，细胞在 24 h 后开始贴壁，48 h 后完全贴壁，细胞为单核，呈长梭形和多角形等形态，10 d 左右细胞融合成铺路石样，并伴有矿化结节的出现；经碱性磷酸酶染色可发现细胞的胞浆内含紫红色颗粒；经钙茜素红染色细胞呈多层重叠生长，细胞局部堆积成灶状，形成钙结节，通过以上鉴定细胞为成骨细胞。

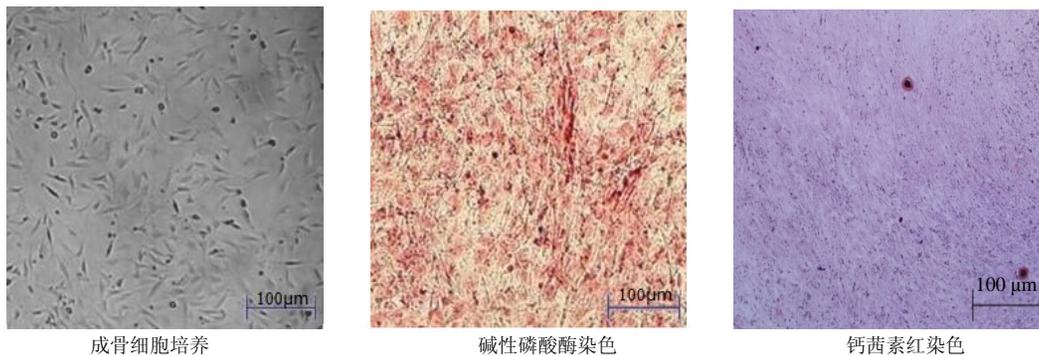


图1 成骨细胞的鉴定

Fig. 1 Osteoblasts' identification

3.2 BMP-2、TGF-β、Smad-1、Smad-2 mRNA 表达的定量

与模型组比较，不同浓度的含药血清组细胞的 BMP-2、TGF-β、Smad-1 的表达均显著提高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；不同浓度的含药血清组 Smad-2 的表达均提高，中、高剂量组差异显著 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 细胞因子 BMP-2、TGF-β、Smad-1、Smad-2 的 qRT-PCR 分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 qRT-PCR analysis of cytokines BMP-2, TGF-β, Smad-1 and Smad-2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	BMP-2/GAPDH	TGF-β/GAPDH	Smad-1/GAPDH	Smad-2/GAPDH
模型	—	1.559±0.1732	1.668±0.1895	1.623±0.1401	1.409±0.1327
刺老菔根皮水提取物	0.9	1.772±0.1810*	2.201±0.2509**	1.890±0.1376*	1.478±0.1370
	1.8	1.968±0.1942*	2.667±0.2011**	1.956±0.1498*	1.563±0.1420*
	3.6	2.032±0.2061**	3.015±0.2410**	2.103±0.1602**	1.668±0.1465*

与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.3 BMP-2、TGF-β、Smad-1、Smad-2 蛋白的 Western blotting 检测结果

与模型组比较，不同浓度的含药血清组细胞的 BMP-2、TGF-β、Smad-1 蛋白表达均提高，且低、中、高浓度组均差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)，见图 2 和表 3。

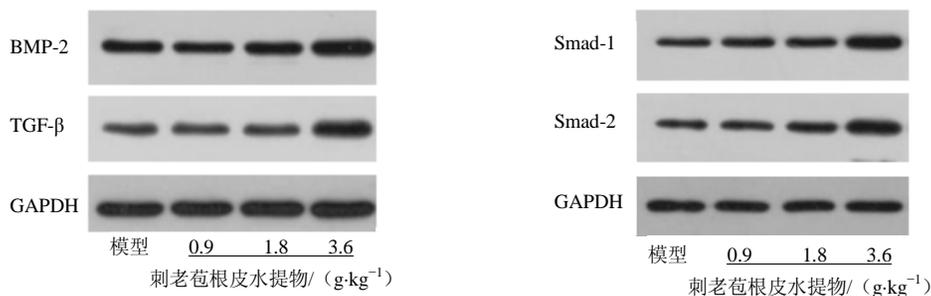


图 2 细胞因子 BMP-2、TGF-β、Smad-1、Smad-2 的 Real-time PCR 分析

Fig. 2 Real-time PCR analysis of cytokines BMP-2, TGF-β, Smad-1 and Smad-2

表 3 细胞因子 BMP-2、TGF-β、Smad-1、Smad-2 的蛋白表达灰度值分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Gray expression analysis of protein expression of cytokines BMP-2, TGF-β, Smad-1 and Smad-2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BMP-2/GAPDH	TGF-β/GAPDH	Smad-1/GAPDH	Smad-2/GAPDH
模型	—	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
刺老苞根皮	0.9	1.350±0.256*	1.320±0.212*	1.316±0.202*	1.289±0.179*
水提取物	1.8	1.680±0.268**	1.525±0.230**	1.530±0.247**	1.470±0.201*
	3.6	1.910±0.280**	1.791±0.261**	1.889±0.279**	1.806±0.256**

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

4 讨论

在早期研究中^[4],本课题组发现刺老苞根皮在骨愈合过程中能刺激骨生成细胞增殖分化,缩短骨痂形成时间,使骨修复提前进入重建期。近年来,对刺老苞的药效学研究^[5]发现,刺老苞总皂苷对泼尼松导致的骨质疏松有良好的对抗作用,而成骨细胞的增殖分化与骨质疏松症有密切联系;通过进一步的研究^[6]发现,刺老苞总皂苷可以预防或降低 H₂O₂ 摄入所导致的 MC3T3-E1 成骨细胞的氧化损伤。

在成骨细胞分化中,受到多种信号通路调控,其中 TGF-β/BMPs、Wnt、MAPK 信号通路发挥了重要作用^[7],TGF-β/BMPs 信号通路中主要的信号因子为 TGF-β 和 BMP。BMP 是一种广泛存在于骨基质中的酸性糖蛋白,在体内通过自分泌和旁分泌形式诱导骨、软骨及骨相关结缔组织的形成,其中 BMP-2 是促进骨形成和诱导成骨细胞分化最重要的细胞外信号分子之一^[8]。TGF-β 是骨基质中最丰富的细胞因子之一,在形成和维护骨架中起主要作用,同时影响软骨和骨代谢^[9]。TGF-β 和 BMP 信号通过 I 型和 II 型跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体和细胞内特定的 Smad 效应蛋白形成异聚复合体,激活 R-Smad 蛋白和 Smad4 基因之间的异聚复合体作为转录因子调控基因转录,最终促进碱性磷酸酶活性和骨形成^[9]。

本实验采用 qRT-PCR 与 Western blotting 对成骨细胞 TGF-β/BMPs 信号通路中细胞因子 BMP-2、TGF-β、Smad-1、Smad-2 表达量进行检测,与模型

组比较,刺老苞含药血清组的基因、蛋白表达量均增加,表明刺老苞根皮含药血清可能激活了 TGF-β/BMPs 信号通路,促使细胞因子 BMP-2、TGF-β、Smad-1、Smad-2 的表达增加,从而促进了成骨细胞的增殖与骨形成能力。

参考文献

- [1] 何景,曾沧江. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 155.
- [2] 方志先,赵晖,赵敬华. 土家族药物志 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2007: 830-835.
- [3] 王萌萌,佟磊,张晓娜,等. 刺老苞根皮总提取物对去势大鼠骨质疏松的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 216-219
- [4] 郑玲玲. 土家药刺老苞根皮干预骨折愈合机制研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2012.
- [5] 王萌萌,依香叫,崔箭,等. 刺老苞总皂苷对抗大鼠泼尼松骨质疏松的作用研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(4): 477-479.
- [6] 王萌萌,崔箭,裴凌鹏. 土家传统药刺老苞总皂苷对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞损伤改善 [J]. 中国民族医药杂志, 2016, 6: 43-46.
- [7] 万晓晨,刘翠平,陈海啸,等. TGF-β/BMPs、Wnt 和 MAPK 信号通路在间充质干细胞向成骨细胞分化中的作用 [J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30: 697-700.
- [8] 王霖霞,李玉坤. BMP-2 信号通路与成骨细胞分化 [J]. 国际骨科学杂志, 2009, 20(2): 132-136.
- [9] 邓伟民,刘丰. 美国骨矿研究学会骨矿盐疾病与代谢性骨病学 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2014: 16.