

葛根素促进人成骨样 MG-63 细胞分化的分子机制研究

赵艳威¹, 李宗旻^{2#}, 宋光明¹, 王 越², 谢文利^{1*}

1. 武警后勤学院 药理学教研室, 天津 300309

2. 武警后勤学院 病原生物与免疫学教研室, 天津 300309

摘要:目的 探讨植物雌激素葛根素促进人成骨样 MG-63 细胞分化的分子机制。方法 选择兼有 2 种雌激素受体(estrogen receptor, ER)亚型表达的人成骨样 MG-63 细胞为研究模型, 采用磷酸苯二钠法、ELISA 法及小 RNA 干扰等技术, 探讨葛根素对人成骨细胞分化的作用及作用机制。结果 葛根素可通过提高 MG-63 细胞中碱性磷酸酶(ALP)活性和 I 型胶原蛋白分泌促进成骨细胞分化成熟, 该作用可被纯 ER 阻断剂 ICI 182, 780 完全阻断, 应用小 RNA 干扰技术进一步证实葛根素对成骨细胞 ALP 活性、I 型胶原蛋白分泌的调节作用是由 ER α 和 ER β 共同介导的。结论 葛根素对成骨细胞分化的调节是经 ER 途径, 由 ER α 和 ER β 共同介导。

关键词: 葛根素; 成骨细胞; 碱性磷酸酶; I 型胶原; 雌激素受体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0536-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.016

Molecular mechanism for promotion of puerarin on differentiation in human osteoblast-like MG-63 cells

ZHAO Yan-wei¹, LI Zong-min², SONG Guang-ming¹, WANG Yue², XIE Wen-li¹

1. Department of Pharmacology, College of Logistics, Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China

2. Department of Pathogenic Biology and Immunology, College of Logistics, Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism for promotion of puerarin on the differentiation in human osteoblast-like MG-63 cells. **Methods** Human osteoblast-like MG-63 cells containing two estrogen receptor (ER) isoforms were selected as the suitable model for this study. Disodium phenyl phosphate method, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and small interfering double-stranded RNAs (siRNA) technologies were performed to investigate the effect of puerarin on the differentiation in human osteoblast-like MG-63 cells and its molecular mechanism. **Results** The promotion of puerarin on osteoblastic differentiation could be performed by increasing alkaline phosphatase (ALP) activity and type I collagen protein secretion in human osteoblastic MG-63 cells. The above effect of puerarin on osteoblast-derived cells could be completely blocked by ER antagonist ICI 182, 780. Using siRNA technology, it was further demonstrated that the effects of puerarin on ALP activity and type I collagen protein secretion were mediated by both ER α and ER β . **Conclusion** The promotion of puerarin on osteoblastic differentiation is through the ER pathway and is mediated via both ER isotypes, ER α and ER β .

Key words: puerarin; osteoblast; alkaline phosphatase; type I collagen; estrogen receptor

骨质疏松症是影响老年人健康及生活质量的严重问题, 随着人类社会的老龄化, 60 岁以上群体中至少有 1/4 的人患有不同程度的骨质疏松症, 更为严重的是骨质疏松症患者的骨骼由于矿物质大量丢

失而变得异常脆弱, 稍有疏忽极易发生多发性骨折。大量的临床和实验研究已证实雌激素替代治疗对绝经后骨质疏松防治效果肯定, 但同时也增加了心血管疾病的相对风险, 长期应用可引发乳腺癌和子宫

收稿日期: 2013-11-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273520); 天津市自然科学基金资助项目(12JCZDJC26300); 武警后勤学院科学技术研究项目(WHZ201202); 天津市自然科学基金资助项目(13JCYBJC24400)

作者简介: 赵艳威(1975—), 女, 硕士, 研究方向为中药药理。Tel: (022)84876735 E-mail: zhaoywei64@sina.com.cn

***通信作者** 谢文利, 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事新药研究与开发。Tel: (022)84876732 E-mail: xiewenli5@sohu.com

为共同第一作者

内膜癌^[1]。因此,寻找防治绝经后骨质疏松症有效而副作用小的理想药物,是目前研究的热点和难点。葛根素是一种异黄酮类化合物,是葛根的主要活性成分,具有降血压、减慢心率、扩张血管的作用,临床上用于高血压、心绞痛、脑供血不足和脑梗死的治疗^[2-5]。前期实验表明,葛根素能剂量依赖性促进大鼠原代成骨细胞分化^[6],但有关葛根素对人成骨细胞分化作用及作用机制的研究尚未见报道。本实验在原工作基础上,以人成骨样 MG-63 细胞为研究模型,该细胞具备特征性成骨细胞功能,并兼表达 2 种雌激素受体(estrogen receptor, ER)亚型^[7],观察葛根素对人成骨细胞分化的作用及作用机制。本研究结果为探讨植物雌激素对成骨细胞的作用机制以及临床应用植物雌激素治疗骨质疏松症提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

葛根素(质量分数 95.5%)购自中国食品药品检定研究院;雷洛昔芬、17 β -雌二醇(E₂)及纯 ER 阻断剂 ICI 182,780 为美国 Sigma 公司产品;胎牛血清(FBS)为中美合资兰州民海生物工程有限公司产品;DMEM 高糖培养基、活性碳处理的 FBS(sFBS)为美国 Gibco 公司产品;碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒购自南京建成生物工程公司;人 I 型胶原蛋白 ELISA 试剂盒购自北京艾然生物科技有限公司。

1.2 细胞系和细胞培养

人成骨样细胞系 MG-63 为美国 ATCC 公司产品,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。按文献方法^[8],将 pGenesil-ER α -siRNA、pGenesil-ER β -siRNA、pGenesil-scrambled-siRNA 分别转染至 MG-63 细胞中,经 G418 压力筛选后,应用免疫印迹技术分别鉴定出 ER α 高抑制稳定表达细胞 MG-63/ER α shRNA(抑制率为 87%),ER β 高抑制稳定表达细胞 MG-63/ER β shRNA(抑制率为 83%)及对照细胞 MG-63/scrambled shRNA。上述细胞均用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液培养。

1.3 药物处理细胞

取对数生长期的 MG-63 细胞,调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL,接种于 12 孔培养板,培养 24 h 待细胞贴壁后更换含 1% sFBS 的无酚红 DMEM 高糖培养基培养 24 h 使细胞同步化,分别应用不同终

浓度的葛根素(0.01、0.1、1 μ mol/L)、雷洛昔芬(0.1 μ mol/L)、E₂(0.1 μ mol/L)或 DMSO 处理 2、4、6 d,每个浓度设 3 个复孔。

1.4 磷酸苯二钠法检测 ALP 活性

培养结束后,收集细胞用 PBS 缓冲液漂洗细胞 3 次,最后 1 次吸干 PBS,加入 0.1% Triton X-100,500 μ L/孔,作用 3 min,用移液器充分吹打,收集入 1.5 mL Ependorf 管中,细胞超声破碎仪破碎后,离心(1 500 r/min,10 min)取上清液,按照 ALP 活性测定试剂盒说明书检测细胞内 ALP 活性。

1.5 I 型胶原蛋白 ELISA 检测

结束培养,收集培养上清,按照 ELISA 试剂盒的说明书检测培养上清中 I 型胶原蛋白的量。

1.6 ER 阻断剂处理细胞

同“1.3”项的方法,不同之处在于取葛根素作用最明显的剂量(0.1 μ mol/L),在加入葛根素前先加入终浓度为 100 μ mol/L ER 阻断剂 ICI 182,780,37 $^{\circ}$ C 作用 30 min,同时设立 ICI 182,780 对照组。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),用 Excel 软件对所获得数据进行分析、处理图表。

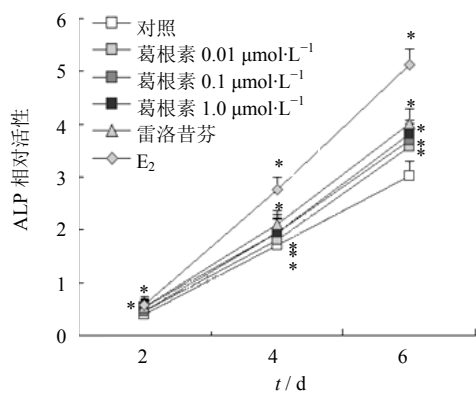
2 结果

2.1 葛根素增强人成骨样 MG-63 细胞 ALP 的活性

用葛根素、雷洛昔芬或 E₂ 处理细胞 2、4、6 d,分别测定细胞的 ALP 活性,结果见图 1。葛根素(0.01、0.1、1 μ mol/L)于 4、6 d 能够显著增强细胞内的 ALP 活性($P < 0.05$),而 2 d 时只有高浓度葛根素(1 μ mol/L)才有此作用($P < 0.05$)。雷洛昔芬和 E₂(0.1 μ mol/L)在相同的时间点也可显著增强细胞内的 ALP 活性($P < 0.05$)。上述结果提示葛根素可通过增强成骨细胞 ALP 的活性而促进成骨细胞分化。

2.2 葛根素促进人成骨样 MG-63 细胞分泌 I 型胶原蛋白

用葛根素、雷洛昔芬或 E₂ 处理细胞 2、4、6 d,分别测定细胞分泌的 I 型胶原,发现不同浓度的葛根素以剂量依赖方式于 4、6 d 显著促进 I 型胶原蛋白的分泌($P < 0.05$),0.1 μ mol/L 的雷洛昔芬和 E₂ 在相同的时间点亦具有此作用(图 2)。提示葛根素也可通过增强成骨细胞 I 型胶原蛋白的分泌而促进成骨细胞分化。



与对照组比较: * $P < 0.05$, 图2同

* $P < 0.05$ vs control group, same as Fig.2

图1 葛根素对人成骨样 MG-63 细胞 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of puerarin on ALP activity in human osteoblast-like MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

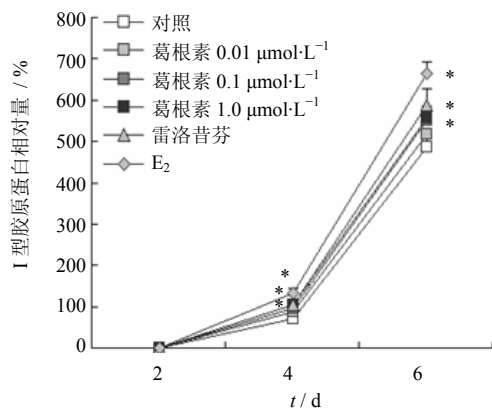
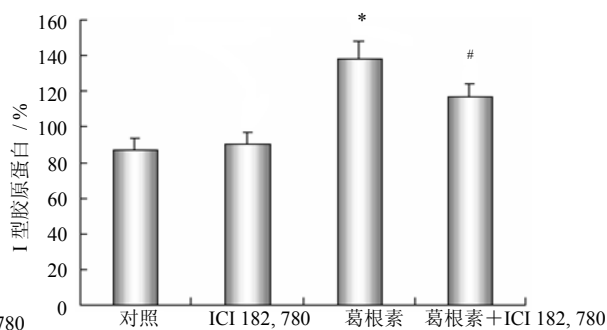
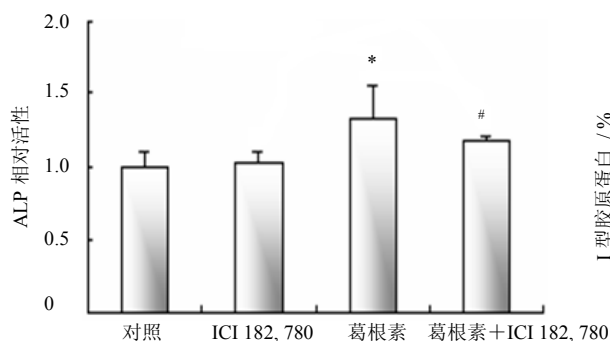


图2 葛根素对人成骨样 MG-63 细胞 I 型胶原蛋白分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of puerarin on type I collagen protein secretion in human osteoblast-like MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与葛根素组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs puerarin group

图3 ICI 182,780 对葛根素促进的人成骨样 MG-63 细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌的阻断作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Blocking effect of ICI 182,780 on ALP activity and type I collagen protein secretion in human osteoblast-like MG-63 cells promoted by puerarin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 ER 阻断剂对葛根素调节成骨细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌作用的阻断作用

为了观察葛根素对成骨细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌的调节作用是否由 ER 途径介导, 在加入葛根素 ($0.1 \mu\text{mol/L}$) 前 30 min 先用 ER 阻断剂 ICI 182,780 ($100 \mu\text{mol/L}$) 处理 MG-63 细胞, 而后应用磷酸苯二钠法和 ELISA 法分别检测 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌水平。由图 3 可见, ICI 182,780 可阻断葛根素诱导的 ALP 活性增强和 I 型胶原蛋白分泌增加 ($P < 0.05$), 而 ICI 182,780 本身对二者的影响不大 ($P > 0.05$), 提示葛根素对成骨细胞的促分化作用是 ER 途径介导的。

2.4 由 ER α 和 ER β 共同介导的葛根素对成骨细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌的促进作用

为了观察葛根素是通过 ER 哪种亚型发挥上述作用的, 应用葛根素处理 MG-63 及其稳定转染的细胞克隆, 随后应用磷酸苯二钠法和 ELISA 法分别检测 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌水平。由图 4 可见, 雷洛昔芬和 E₂ 对 MG-63/scrambled shRNA 细胞与未转染的 MG-63 细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌的促进作用差异不大; 二者对 MG-63/ER α shRNA 细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌的促进作用则较 MG-63/scrambled shRNA 及未转染的 MG-63 细胞明显减弱 ($P < 0.05$), 而对 MG-63/ER β shRNA 细胞的作用影响不大 ($P > 0.05$); 葛根素对上述细胞 ALP 活性和 I 型胶原分泌的促进作用无显著差异 ($P > 0.05$)。上述结果提示葛根素对成骨细胞的促分化作用是由 ER α 和 ER β 共同介导, 而雷洛昔芬和 E₂ 对成骨细胞的促分化作用则主要是由 ER α 介导的。

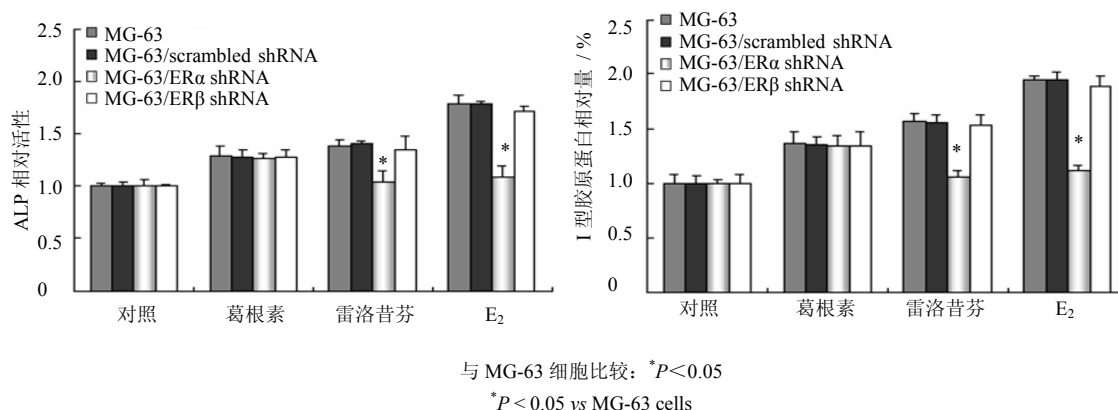


图4 葛根素对 MG-63/ERα shRNA 和 MG-63/ERβ shRNA 细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of puerarin on ALP activity and type I collagen protein secretion in MG-63/ERα shRNA and MG-63/ERβ shRNA cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

流行病学、实验研究和临床资料表明,大豆异黄酮化合物大豆苷元可抑制去卵巢大鼠骨丢失,但其对子宫基本无雌激素的刺激作用^[9]。葛根素和大豆异黄酮同属植物雌激素,二者结构极其相似,仅在 C-8 位相差一糖基,因此推测,葛根素可能具有和大豆苷元相似的对骨的药理活性。

ALP 是一种同源二聚体糖蛋白,是成骨细胞分化成熟的标志,也是最常见的评价成骨细胞分化功能的早期生化指标。ALP 可分解有机磷酸释放无机磷,增加局部无机磷酸的浓度,促进矿化,它是骨形成所必需的酶,其表达随着细胞分化的发展而增强^[10],它的活性反映了成骨细胞的分化功能。前期研究发现^[6],葛根素可增强体外培养的原代大鼠成骨细胞分泌 ALP 的活性。本研究发现,随着培养时间的延长,成骨细胞合成和分泌 ALP 的能力也逐渐增强,与文献报道一致^[10]。在 0.01~1 μmol/L 剂量内,葛根素以剂量依赖方式显著增加细胞内 ALP 活性,但在等物质的量条件下对 ALP 活性的促进作用要明显弱于雷洛昔芬和 E₂。

I 型胶原蛋白是成骨细胞分化成熟的另一重要标志。本实验结果表明,随着培养时间的延长,成骨细胞合成和分泌 I 型胶原蛋白的能力也逐渐增强,但是增强幅度却很小。在 0.01~1 μmol/L 剂量内,葛根素以剂量依赖方式显著增加细胞 I 型胶原蛋白的量,但在等物质的量条件下葛根素对 I 型胶原分泌的促进作用也要明显弱于雷洛昔芬和 E₂。

葛根素对成骨细胞 ALP 活性和 I 型胶原蛋白分泌的促进作用可被 ER 阻断剂 ICI 182,780 阻断,提

示葛根素可能通过 ER 途径对成骨细胞发挥促分化作用。应用 siRNA 技术进一步证明葛根素对成骨细胞的促分化作用是由 ERα 和 ERβ 共同介导的。葛根素对成骨细胞的上述作用与另一种大豆异黄酮化合物染料木黄酮的作用相似,Rickard 等^[11]证实染料木黄酮可通过 ERα 和 ERβ 对人成骨细胞发挥弱雌激素样作用;而与 Song 等^[12]研究结果相异,异黄酮类化合物的作用主要是通过 ERβ 来介导的,其原因可能是由于异黄酮类化合物之间个体差异^[13]、成骨细胞来源的种属差异和取骨部位不同、成骨细胞分化阶段不同、培养条件不同或 ER 及其亚型的表达不同造成的。

参考文献

- [1] 单春艳,郑少雄,陈莉明,等.绝经后激素替代治疗的妇女发生骨质疏松时某些细胞因子水平的改变[J].中国骨质疏松杂志,2002,8(4):293-295.
- [2] 朱庆磊,吕欣然.葛根素的药理学和临床应用研究进展[J].中草药,1997,28(11):693-696.
- [3] 梅志刚,王明智,刘晓洁,等.葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤 α7nAChR、NF-κBp65 及 STAT3 mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(1):113-117.
- [4] 王维维.葛根素对大鼠缺血性脑损伤的保护作用[J].江苏大学学报:医学版,2013,23(5):373-376.
- [5] 张环宇,李大伟,史彩虹.葛根素的临床应用研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(1):75-78.
- [6] 王久亮,郑忠志,李灵芝,等.葛根素对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,36(11):7138-7141.
- [7] Luo X H, Liao E Y. Effects of estradiol on the proliferation and differentiation of human osteoblastic MG-63 cells[J].

- Endocr Res*, 2003, 29(3): 343-351.
- [8] 祁琳, 张鹏, 屈野, 等. LC调节人成骨样MG-63细胞表达OPG、RANKL分子机制的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 1(2): 125-130.
- [9] 徐霞, 贡沁燕, 鲁映青, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨密度和雌激素活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21(6): 321-325.
- [10] Sun J S, Li Y Y, Liu M H, *et al.* Effects of coumestrol on neonatal and adult mice osteoblasts activities [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81(1): 214-223.
- [11] Rickard D J, Monroe D G, Ruesink T J, *et al.* Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(3): 633-646.
- [12] Song W O, Chun O K, Hwang I, *et al.* Soy isoflavones as safe functional ingredients [J]. *J Med Food*, 2007, 10(4): 571-580.
- [13] Veronica G P, Lisa J R, Christopher W B, *et al.* Negative Regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264. 7 cells by estrogen and phytoestrogens [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 13720-13727.