芫花素对于 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化的影响

贾　军[1]，费乔曼[2]，邱曼曼[2]，王雯雯[2]，黄　欢[2]，杨　冰[2]，张　玲[2]，梅　玫[2]，周　慧[3*]
1. 天津市天津医院 足踝二病区，天津　300211
2. 天津医科大学 基础医学院，天津　300070
3. 天津医科大学 药学院，天津　300070

摘　要：目的　探索芫花素对于 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化的影响。**方法**　采用芫花素 1、5、10、15 μmol/L 处理 MC3T3-E1 细胞 14 d，采用 MTS 法检测芫花素对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用；实时定量 PCR 和 Western blotting 法检测测芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP、HDAC1 和 Runx2 mRNA 和蛋白表达的影响。**结果**　芫花素 5、10、15 μmol/L 可以显著促进 MC3T3-E1 细胞中 ALP、Runx2 mRNA 和蛋白表达水平的提高（P＜0.05），HDAC1 mRNA 和蛋白表达水平的下调（P＜0.05），表明芫花素可以促进 MC3T3-E1 向成骨细胞分化。**结论**　芫花素具有促进 MC3T3-E1 细胞可以促进成骨细胞分化，对成骨细胞的分化过程有一定的调节作用。

关键词：芫花素；成骨细胞；ALP；HDAC1；Runx2
中图分类号：R966　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2020)01 - 0012 - 04
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.01.003

Effect of genkwanin on the differentiation of MC3T3-E1 cell into osteoblasts

JIA Jun[1], FEI Qiao-man[2], QIU Man-man[2], WANG Wen-wen[2], HUANG Huan[2], YANG Bing[2], ZHANG Ling[2], MEI Mei[2], ZHOU Hui[3]
1. NO. 2 Ankle Ward, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China
2. School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
3. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective　To study the effect of genkwanin on the differentiation of MC3T3-E1 cell into osteoblast. **Methods**　The MC3T3-E1 cell was treated with genkwanin 1, 5, 10, and 15 μmol/L for 14 d. Inhibition of genkwanin on proliferation of MC3T3- E1 cell was detected by MTS method. Effect of genkwanin on ALP、HDAC1, and Runx2 mRNA and protein expressions of MC3T3- E1 cell was detected by the real-time quantitative PCR and Western blotting. **Results**　Genkwanin 5, 10, and 15 μmol/L could promote the expression of ALP and Runx2 mRNA and protein expressions in MC3T3-E1 cells (P < 0.05), but inhibit the expression of HDAC1 mRNA and protein expressions in MC3T3-E1 cells (P < 0.05). **Conclusion**　Genkwanin has the action of promoting the differentiation of MC3T3-E1 cell into osteoblasts, and can regulate the differentiation process of osteoblasts.

Key words: genkwanin; osteoblast; ALP; HDAC1; Runx2

芫花素系统命名 5, 4′-二羟基-7-甲氧基黄酮，1932 年由中国药物学家曾广方和日本学者中尾万三合作首次从芫花中提取分离得到，研究表明其具有抑制子宫运动等功能[1]，但是其对成骨细胞分化的影响研究较少。组蛋白去乙酰化酶（HDACs）和组蛋白乙酰化酶（HATs）作为重要的表观遗传学因子，参与了多种信号通路的调节，如 I 型和 II 型糖尿病的病理过程[2]。HDACs 家族分为 4 类，共 18 种，其中 I、II、IV 类共有 11 种，称为经典 HDACs；III 类种含有 7 种，被称为 Sirtuins。抑制 HDAC1 的表达可以诱发 Runx2 表达水平的上调，促进成骨细胞的分化[3]。本研究表明使用芫花素能提高成骨细胞前体细胞分化水平，细胞实验表明芫花素可改变成骨细胞的乙酰化水平。

收稿日期：2019-11-10
基金项目：天津市卫生计生委、天津市中医药管理局中医、中西医结合课题资助项目（2017063）
作者简介：贾　军，研究方向为创伤骨科。
***通信作者**　周　慧，女，药学专业。E-mail: zhouhui@tmu.edu.cn

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

芫花素（Merck 公司，货号 SMB00422，质量分数≥98%）；MC3T3-E1 细胞购自国家实验细胞资源共享平台；RNAiso Plus（中国 Takara）；HiScript Reverse Transcriptase（中国诺唯赞）；BrightGreen 2×qPCR MasterMix-ROX（加拿大 abm 公司）；Western 及 IP 细胞裂解液（中国碧云天）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（美国 Pierce 公司）；Immun-Blot PVDF 膜（美国 BIO-RAD 公司）；α-MEM 培养基（美国 Gibico 公司）；胎牛血清（中国 Excellbio 公司）；碱性磷酸酶检测试剂盒（中国碧云天）；兔 ALP 多克隆抗体（美国 Abcam 公司）；兔 Runx2 单克隆抗体（美国 Abcam，货号 ab192256）；兔抗 HDCA1 多克隆抗体（美国 Abcam，货号 ab19845）；兔 β-actin 多克隆抗体（美国 Abcam，货号 ab8227）；鼠抗兔二抗（美国 Abcam，货号 ab99696）；细胞培养箱采用 Thermo Forma 311 直热式 CO_2 细胞培养箱；实时定量 PCR 仪采用 ABI 7500 Fast；多孔板检测器采用 BiotekCytation 5。

1.2　细胞培养

MC3T3-E1 细胞在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱中采用含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 α-MEM 培养基，每 2 天换 1 次液。采用芫花素 1、5、10、15 μmol/L 设置不同组别进行实验。成骨细胞诱导分化采用本实验室常用方法[4]。

1.3　芫花素对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用

采用 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay（MTS）试剂盒检测 MC3T3-E1 细胞的增殖情况，加药后 48 h 进行检测，具体操作按照试剂盒说明书进行，每个剂量组有 6 个重复孔。

抑制率＝1－$A_{实验}/A_{对照}$

1.4　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP、HDAC1 和 Runx2 的 mRNA 表达的影响

按照 RNAiso Plus 试剂说明书提取总 RNA。总 RNA 样本采用 Nanodrop 2000 检测 260 nm 处的吸光度（A_{260}）/A_{280} 比值，确定 RNA 纯度及浓度，采用 RNA 电泳检测 RNA 完整性。采用 HiScript Reverse Transcriptase 按照说明书进行总 RNA 逆转录。

按照 BrightGreen 2×qPCR MasterMix-ROX 试剂盒说明书，在 ABI7500FAST 仪器上进行实时定量 PCR 操作，PCR 反应体系为 2×qPCR MasterMix 10 μL、上游引物 0.4 μL、下游引物 0.4 μL、cDNA 2 μL、H_2O 7.2 μL。反应条件为：50 ℃ 2 min；95 ℃ 5 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 40 s，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因 mRNA 表达水平。每个样品采用 3 个复孔，实验重复 3 次。本实验所采用的引物序列见表 1。

表 1　实时定量 PCR 引物序列

Table 1　Primer sequense of target gene

基因名称	引物序列（5′-3′）	产物大小/bp
ALP	上游引物：TCAGGGCAATGAGGTCACATC	67
	下游引物：CACAATGCCCACGGACTTC	
HDAC1	上游引物：CCCATGAAGCCTCACCGAAT	226
	下游引物：CAAACACCGGACAGTCCTCA	
Runx2	上游引物：CGGCCCTCCCTGAACTCT	75
	下游引物：TGCCTGCCTGGGATCTGTA	
β-actin	上游引物：CTGAGGAGCAGCTTCAGTCC	175
	下游引物：GGCCATGTCCAACTCCATCA	

1.5　Western blotting 法检测芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP、HDAC1 和 Runx2 蛋白表达的影响

将细胞采用 PBS 液清洗 3 次，1 000 r/min 离心 15 min，收集细胞，采用 Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞后，加入上样缓冲液煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 20 min 后取上清，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，采用半干转的方法将蛋白转移至 PVDF 膜上，采用 5%脱脂牛奶（英国 BD）室温封闭 1 h，采用 Runx2、HDAC1、ALP（稀释比例 1∶2 000）、β-actin（稀释比例 1∶2 000）4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。分别用鼠抗兔二抗 4 ℃孵育过夜后，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。采用 ECL 化学发光检测，采用 UVITEC 化学发光成像分析系统 Alliance MINI HD6 进行拍照记录。

1.6　统计学方法

所有实验重复 3 次，结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计分析，组间均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2　结果

2.1　芫花素对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用

芫花素 1、5、10、15 μmol/L 处理 MC3T3-E1 细胞 24 h，对 MC3T3-E1 细胞增殖没有显著性的抑制作用，芫花素对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用见表 2。

2.2　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP、HDAC1 和 Runx2 的 mRNA 表达的影响

与对照组比较，芫花素 5、10、15 μmol/L 可以显著促进 MC3T3-E1 细胞中 ALP mRNA、Runx2 mRNA 表达水平的提高（P＜0.05），HDAC1 mRNA 表达水平的下调（P＜0.05），表明芫花素可以促进 MC3T3-E1 向成骨细胞分化。见表 3。

表 2　芫花素对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用（$\bar{x} \pm s$, $n = 6$）

Table 2　Inhibition of genkwanin on proliferation of MC3T3-E1 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	抑制率
对照	—	0.878±0.030
芫花素	1	0.801±0.041
	5	0.845±0.067
	10	0.818±0.059
	15	0.834±0.055

2.3　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP、HDAC1 和 Runx2 蛋白表达的影响

与对照组比较，芫花素 5、10、15 μmol/L 可以显著促进 MC3T3-E1 细胞中 ALP、Runx2 蛋白表达水平的提高（P＜0.05），HDAC1 蛋白表达水平的下调（P＜0.05），表明芫花素可以促进 MC3T3-E1 向成骨细胞分化。见表 4、图 1～3。

3　讨论

芫花素存在于多种唇形科、蒺藜科、蔷薇科植

表 3　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP、HDAC1 和 Runx2 的 mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Table 3　Effects of genkwanin on ALP、HDAC1, and Runx2 mRNA expressions of MC3T3- E1 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	ALP mRNA 相对表达量	HDAC1 mRNA 相对表达量	Runx2 mRNA 相对表达量
对照	—	0.190±0.032	1.027±0.064	1.066±0.131
芫花素	1	0.606±0.092	0.972±0.057	1.112±0.826
	5	4.330±0.321*	0.613±0.014*	1.420±0.063*
	10	6.073±0.152*	0.392±0.106*	1.732±0.059*
	15	6.937±0.232*	0.444±0.020*	1.899±0.054*

与对照组比较：*P＜0.05

*P < 0.05 *vs* control group

表 4　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP、HDAC1 和 Runx2 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Table 4　Effects of genkwanin on ALP, HDAC1, and Runx2 proteins of MC3T3- E1 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	ALP 蛋白相对表达量	HDAC1 蛋白相对表达量	Runx2 蛋白相对表达量
对照	—	54 861±1 336	186 178±6 361	96 512±4 121
芫花素	1	61 105±2 340	17 8342±7 426	107 425±2 317
	5	124 880±5 667*	112 042±8 615*	118 114±1 922*
	10	148 245±6 315*	68 955±5 352*	217 579±7 743*
	15	131 872±33 825*	99 040±4 573*	228 029±3 981*

与对照组比较：*P＜0.05

*P < 0.05 *vs* control group

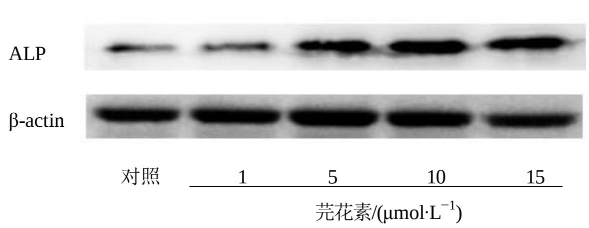

图 1　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 ALP 蛋白表达的影响

Fig. 1　Effects of genkwanin on ALP protein of MC3T3-E1 cell

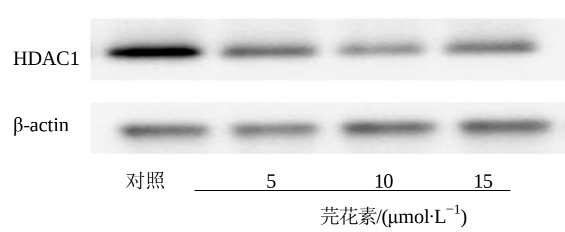

图 2　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 HDAC1 蛋白表达的影响

Fig. 2　Effects of genkwanin on HDAC1 protein of MC3T3-E1 cell

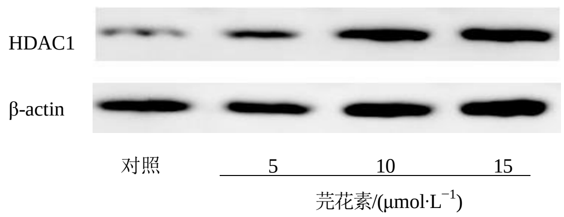

图 3　芫花素对 MC3T3-E1 细胞中 Runx2 蛋白表达的影响

Fig. 3　Effects of genkwanin on Runx2 protein of MC3T3-E1 cell

物中。芫花素属于非糖基化黄酮类化合物。其可以减少药物流产大鼠的子宫出血量，升高体内雌二醇质量浓度，缩短凝血酶原时间和凝血酶时间，可促进子宫复旧及子宫内膜修复[1]。芫花素可促进小鼠凝血功能，具有一定的镇痛和抗炎作用[5]。芫花素可以通过PKC途径诱导细胞间隙连接蛋白Cx43表达的下调，进而起到细胞间隙连接通讯抑制的作用[6]。

成骨细胞来源于间充质干细胞（MSCs）。对于 MSCs 的后续的细胞分化，一般由所谓的主转录调节子决定。ALP 可以作为成骨细胞分化成熟的标志物对于成骨细胞谱系决定而言，Runx2 起到了重要的调控作用[7]。Runx2 敲除的小鼠不能形成矿物化的骨骼，而过表达 Ruxn2 则可以激活成骨细胞相关的转录过程[8]。人 Runx2 缺失突变会导致锁骨颅骨发育不全症（CCD）的发生[9]。当 MSCs 中 RUNX2 基因被激活，启动了 MSCs 向成骨细胞分化的过程，在与大多数成骨细胞相关基因启动子附近的成骨细胞特异性顺式作用元件结合，激活包括骨钙蛋白、骨桥蛋白和骨涎蛋白（BSP）在内的骨形成和矿化所必须的细胞外基质蛋白，此外还可以激活成骨细胞关键调节因子 Osterix[10-11]。HDAC1 是重要的表观遗传学因子。其在乳腺癌、肾细胞癌和霍奇金淋巴瘤等多种肿瘤细胞中表达上调[12]。HDAC1 在肿瘤干细胞中表达水平较高，其对肿瘤干细胞维持其干细胞状态具有重要的功能[13]。独立生长因子（GFI1）可以通过中间域募集 HDAC1 对细胞周期调节蛋白 CDKN1A 的启动子进行抑制，并且可以对成骨细胞的分化产生抑制[14-15]。

芫花素具有促进 MC3T3-E1 细胞可以促进成骨细胞分化，对成骨细胞的分化过程有一定调节作用。

参考文献

[1] 樊江波, 张格林. 芫花素对流产大鼠出血量、激素水平及子宫内膜修复的影响 [J]. 西北药学杂志，2019, 34(1): 57-61.
[2] Christensen D P, Mattias Dahllöf, Lundh M, *et al*. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus [J]. *Mol Med*, 2011, 17(5/6): 378-90.
[3] Liu T, Hou L, Zhao Y, *et al*. Epigenetic silencing of HDAC1 by miR-449a upregulates Runx2 and promotes osteoblast differentiation [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1): 238-246.
[4] Yang B, Tang Q, Post J *et al*. Effect of radiation on the Notch signaling pathway in osteoblasts [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(3): 698-706.
[5] 樊江波，黄琳红. 益母草活性成分芫花素对小鼠凝血及抗炎作用的研究. [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2019. 40(1): 158-161.
[6] 文海若, 刘　倩, 王　丹. 芫花素和染料木黄酮的细胞间隙连接通讯抑制机制研究 [C]. 中国毒理学会中药与天然药物毒理专业委员会第二次（2017 年）学术交流大会论文集. 苏州: 中国毒理学会, 2017: 184-185.
[7] Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation [J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4): 313-323.
[8] Kawane T, Qin X, Jiang Q, *et al*., Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3 [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13551.
[9] Jaruga A, Hordyjewska E, Kandzierski G, *et al*. Cleidocranial dysplasia and RUNX2-clinical phenotype-genotype correlation [J]. *Clin Genet*, 2016, 90(5): 393-402.
[10] Arkady Rutkovskiy, Kåre-Olav Stensløkken, Ingvar Jarle Vaage. Osteoblast Differentiation at a Glance [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2016, 22: 95-106.
[11] Zainabadi K, Liu C J, Guarente L. SIRT1 is a positive regulator of the master osteoblast transcription factor, RUNX2 [J]. *PloS one*, 2017, 12(5): e0178520.
[12] Cao L L, Song X, Pei L, *et al*. Histone deacetylase HDAC1 expression correlates with the progression and prognosis of lung cancer: a meta-analysis [J]. *Medicine*, 2017, 96(31): e7663.
[13] Witt A E, Lee C W, Lee T I, *et al*. Identification of a cancer stem cell-specific function for the histone deacetylases, HDAC1 and HDAC7, in breast and ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(12): 1707.
[14] Maiques-Diaz A, Spencer G J, Lynch J T, et al. Enhancer activation by pharmacologic displacement of LSD1 from GFI1 induces differentiation in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(13): 3641-3659.
[15] Adamik J, Jin S, Sun Q, *et al*. EZH2 or HDAC1 inhibition reverses multiple myeloma-induced epigenetic suppression of osteoblast differentiation [J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(4): 405-417.