

天料木中异香豆素糖苷化合物对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化及 OPG/RANKL/RANK 信号通路的影响

张玉琴^{1,2}, 孙承韬¹, 王宏运¹, 徐伟^{1*}, 褚克丹¹

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 海南师范大学热带药用植物化学教育部重点实验室, 海南 海口 571127

摘要: 目的 探讨天料木中异香豆素糖苷化合物 4-hydroxy-2- { [(benzoyl) oxy] methyl} phenyl- β -D-glucopyranoside-6-benzoate (HPGB) 对小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1 细胞活性的影响及其作用机制。方法 体外培养 MC3T3-E1 细胞, 用不同浓度的异香豆素糖苷化合物进行干预, 采用 MTT 法测定 MC3T3-E1 细胞增殖情况, 碱性磷酸酶 (ALP) 测定细胞分化情况, 悬液芯片技术检测、分析糖蛋白 Dickkopf (DKK-1)、骨保护素 (OPG)、骨桥蛋白 (OPN)、骨钙素 (BGP) 和核因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白表达水平。Real-time PCR 法检测、分析 DKK-1、RANKL mRNA 的表达水平。结果 异香豆素糖苷化合物在 3~300 μ mol/L 可促进 MC3T3-E1 细胞增殖和分化能力, 具有浓度相关性; 与正常对照组相比, 异香豆素糖苷化合物可提高 MC3T3-E1 的 ALP 活性。蛋白结果表明, 异香豆素糖苷化合物可显著上调 MC3T3-E1 细胞中 OPG、OPN 的表达, DKK-1、RANKL 蛋白表达无明显变化, 但显著提高了 OPG/RANKL 值。同时, mRNA 结果显示异香豆素糖苷化合物可显著上调 MC3T3-E1 细胞中 OPG mRNA 表达, 显著提高 OPG/RANKL 值。结论 异香豆素糖苷化合物可通过上调 OPG、OPN 的表达、提高 OPG/RANKL 值, 促进 MC3T3-E1 的增殖和分化。

关键词: 天料木; 异香豆素糖苷化合物; MC3T3-E1 细胞; 骨形成; OPG/RANKL/RANK 信号通路

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 08-1515-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.08.005

Mechanism of isocoumarin glycoside from stems of *Homalium paniculiflorum* on activity of MC3T3-E1 cells via OPG/RANKL/RANK pathway

ZHANG Yuqin^{1,2}, SUN Chengtao¹, WANG Hongyun¹, XU Wei¹, CHU Kedan¹

1. Pharmacy College of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Ministry of Education, Haikou 571127, China

Abstract: **Objective** To explore the possible mechanism of isocoumarin glycoside from the stems of *Homalium paniculiflorum* on MC3T3-E1 cells activity. **Methods** The MC3T3-E1 cells were cultured and stimulated with various concentrations of isocoumarin glycoside for 48 h. And then, MTT and ALP assay were used to analyze the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells, respectively. the protein expressions of Dickkopf (DKK-1), Osteoprotegerin (OPG), Osteopontin (OPN), Bone gla protein (BGP) and Receptor activator of NK- κ B ligand (RANKL) were detected by suspension chip technology. Furthermore, the mRNA expressions of OPG and RANKL were evaluated by Real-time PCR. **Results** Isocoumarin glycoside increased the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells. Further mechanism analysis showed that isocoumarin glycoside significantly promoted the protein expression of OPG, OPN and OPG/RANKL ratio. While the protein expression of DKK-1 and RANKL had no obvious change. mRNA results showed that isocoumarin glycoside obviously promoted the mRNA expression of OPG and OPG/RANKL ratio. **Conclusion** Isocoumarin glycoside increased MC3T3-E1 cells proliferation and differentiation through OPG/RANKL/RANK pathway, and induce bone formation.

Key words: *Homalium paniculiflorum* How et Ko.; isocoumarin glycoside; MC3T3-E1 cells; bone formation; OPG/RANKL/RANK pathway

收稿日期: 2019-01-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81370096); 海南师范大学热带药用植物化学教育部重点实验室开放基金项目

第一作者: 张玉琴(1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效学及作用机制研究。Tel: (0591)22861135 E-mail: zyqfj@hotmail.com。

*通信作者: 徐伟, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础研究。Tel: (0591)22861693 E-mail: 2000017@fjtc.edu.cn

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种全身性骨代谢疾病,其特征为骨量减少、骨微细结构退化^[1],主要体现在骨密度降低和骨质量(包括骨显微结构、骨代谢转换、骨矿化以及骨微损伤的累积)减少,从而导致骨强度减弱,微骨折增加^[2-3]。中老年妇女为常发群体。骨代谢与骨质疏松紧密相关。骨代谢依赖于成骨细胞所导致的骨形成与破骨细胞所导致的骨吸收这一过程,骨代谢和骨转换的过程就是成骨细胞形成新骨和破骨细胞吸收旧骨的过程^[4-5]。骨质疏松的发病机制是骨吸收和骨形成的失衡。成骨细胞功能受损则会引起骨质疏松症。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,对骨组织的生长发育、损伤修复、骨代谢平衡以及骨量的维持起到关键作用。骨保护素(OPG)/核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)/核因子- κ B受体活化因子(RANK)系统在破骨细胞分化成熟起关键作用。伴随着分子生物学在骨科疾病领域中不断地深化研究,OPG-RANKL-RANK信号通路已作为治疗骨代谢疾病的新药物靶点^[6],其作用机制为破骨细胞前体上的RANKL与RANK相结合,刺激破骨细胞的分化和激活,同时抑制其凋亡;此外,OPG作为一种负调节作用抑制RANKL与RANK的结合。因此OPG/RANKL/RANK信号途径是骨代谢中重要的信号通路。

现代药理学发现有一些成分如异黄酮类、香豆素类、木脂素类,其结构与雌激素类似,被称为植物雌激素,对内源性雌激素起双向调节作用,在防治骨质疏松等方面有着重要意义^[7]。天料木属于大风子科天料木属的植物,种属约有130种,是热带与亚热带独有的药用植物资源^[8],据已有文献报道,天料木中已知有酚甙、环烯醚萜、香豆素、三萜类等化合物,具有抗菌、抗氧化、抗病毒、降血脂等生物活性^[9-10]。作为海南优势种的广南天料木 *Homalium paniculiflorum* How et Ko., 课题组前期初步筛选了天料木醇提取物的抗骨质疏松活性,同时对其化学成分进行了分离鉴定并进行了活性筛选,发现其具有较强的促进小鼠胚胎成骨细胞MC3T3-E1增殖的作用。但其对成骨细胞内信号系统的作用机制尚不清楚。因此,本实验对分离得到的新化合物异香豆素糖苷化合物4-hydroxy-2-[(benzoyl)oxy]methyl-phenyl- β -D-glucopyranoside-6-benzoate(HPGB)进行进一步研究,根据前期预实验结果选择了HPGB的3、30、300 μ mol/L 3个工作浓度探讨其对MC3T3-E1细胞活性及OPG/RANKL/

RANK信号通路的影响,为海南丰富的热带药用植物广南天料木的开发应用提供理论基础。

1 材料

1.1 药物

HPGB为课题组从广南天料木中提取、分离获得,为异香豆素糖苷化合物^[11]。无菌条件下少量DMSO溶解后用含1%胎牛血清 α -MEM培养基配制成1 mg/mL的母液,使用时稀释成不同浓度的工作液(DMSO含量小于0.1%)。

1.2 主要试剂与仪器

α -MEM培养基, Gibco公司;胰酶, Gibco公司;噻唑蓝(MTT), Sigma公司; DKK-1、RANKL、OPG、RANK单克隆抗体, Abcam公司;碱性磷酸酶(ALP)活力测试试剂盒, 南京建成生物工程研究所; RevertAidTM First strand cDNA Synthesis Kit, Fermenta公司; Power SYBR® Green PCR Master Mix, Life Sciences公司。凝胶成像仪, 美国伯乐公司; PCR扩增仪, 美国伯乐公司; 7900型荧光定量PCR仪, ABI公司。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠胚胎成骨细胞MC3T3-E1购于中科院上海细胞库。细胞于含有10%胎牛血清的 α -DMEM培养基中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,待其融合度至80%~90%时,用0.25%胰酶消化进行传代培养。

2.2 细胞相对增殖的检测

将MC3T3-E1细胞种于96孔板中,密度为 1×10^4 个/孔。种板24 h后,将细胞分为空白对照组和HPGB 3、30、300 μ mol/L组,每组设立6个复孔。药物干预48 h后,每孔分别加入0.5 mg/mL MTT 10 μ L。在CO₂培养箱中孵育4 h后,弃去培养基,每孔加入100 μ L DMSO,室温振荡混匀,采用多功能酶标仪在570 nm波长处测定各孔吸光度(A)值。

细胞相对增殖率=给药组A值/对照组A值

2.3 碱性磷酸酶活性检测

将MC3T3-E1细胞以 5×10^5 个/孔密度种于6孔板中,24 h后,将细胞组为空白对照组和HPGB 3、30、300 μ mol/L组,每组设立3个复孔。药物干预48 h后,弃去培养基,用PBS洗涤3次,每孔加入150 μ L裂解液,在冰上裂解10 min。15 000 r/min、4℃离心10 min,即得上清液。严格按照ALP活力检测试剂盒(微板法)说明书对得到的蛋白样品进行操作,同时使用BCA试剂盒测定其蛋白浓度。在520 nm波

长下,使用酶标仪测定各孔A值,以此检测ALP的活性。

ALP含量=[(测定孔A值-空白孔A值)/标准品A值]×标准品含量

2.4 DKK-1、OPG、OPN和RANKL蛋白表达水平的检测

将MC3T3-E1细胞种于6孔板,密度为 5×10^5 个/孔。细胞分组为空白对照组和HPGB 3、30、300 $\mu\text{mol/L}$ 组,每组设立3个复孔。药物干预48 h后,用PBS洗涤3次,每孔加入150 μL 裂解液,在冰上裂解10 min。15 000 r/min、4℃离心10 min,获得上清液,采用液相芯片分析系统,具体操作按照说明书严格执行,以此测定DKK-1、OPG、RANKL和RANK的

蛋白含量。

2.5 OPG和RANKL mRNA表达水平检测

将MC3T3-E1细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板,将细胞分为空白对照组和HPGB 3、30、300 $\mu\text{mol/L}$ 组,每组设立3个复孔。药物干预48 h后,按照RNeasy Protect Cell Mini Kit说明书步骤进行细胞总RNA的提取,按照RevertAidTM First strand cDNA Synthesis Kit说明书步骤进行逆转录准备cDNA。实时荧光定量聚合酶链反应(Real-Time PCR)检测DKK-1、OPG、RANKL和RANK mRNA的相对表达量,引物序列见表1。Real-time PCR检测以 β -actin为内参基因,计算给药组相对于正常组目的基因的表达量,最终结果用相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列	产物长度/bp
OPG	Forward 5'-CAGAGAAGCC ACGCAAAAAGTG-3'	175
	Reverse 5'-AGCTGTGTCTCCGTTTATCCT-3'	
RANKL	Forward 5'-GATGAAAGGAGGGAGCACG-3'	125
	Reverse 5'-AAGGGTTGGACCTGAATG-3'	
GADPH	Forward 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	174
	Reverse 5'-GCTTCACCACCTTCTTGATGTC-3'	

2.6 统计学方法

采用SPSS21.0统计软件进行分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 HPGB对MC3T3-E1细胞增殖的影响

采用MTT法检测细胞增殖,实验结果(图1)表明,与对照组比较,随着异香豆素糖苷HPGB浓度(3、30、300 $\mu\text{mol/L}$)的增加均能促进MC3T3-E1细胞增殖,其中30、300 $\mu\text{mol/L}$ 组差异有显著性($P < 0.01$)。提示异香豆素糖苷HPGB化合物可明显促进MC3T3-E1细胞的增殖,且具有浓度相关性。

3.2 HPGB对MC3T3-E1细胞分化的影响

检测细胞ALP活性,实验结果(图2)显示,与对照组相比,不同浓度HPGB(3、30、300 $\mu\text{mol/L}$)可显著提高MC3T3-E1细胞ALP活性,具有显著性差异($P < 0.05$)。提示HPGB化合物可明显增强MC3T3-E1细胞分化。

3.3 HPGB对MC3T3-E1细胞DKK-1、OPG、BGP、OPN和RANKL蛋白表达水平的影响

采用悬液芯片技术检测、分析DKK-1、OPG、BGP、OPN和RANKL的蛋白表达水平,实验结

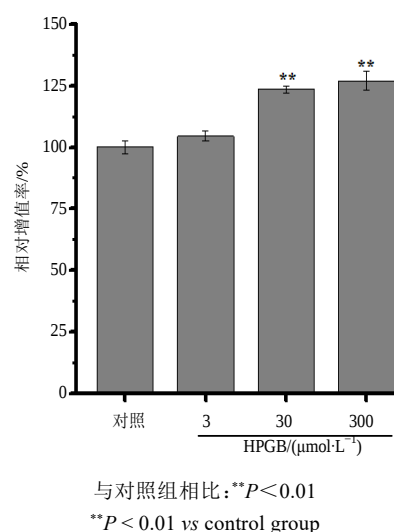


图1 异香豆素糖苷HPGB化合物对MC3T3-E1细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of HPGB on proliferation of MC3T3-E1 cells

果(表2)显示,与对照组相比,不同浓度HPGB(3、30、300 $\mu\text{mol/L}$)组OPG、BGP和OPN的蛋白表达量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01),而DKK-1和RANKL的蛋白表达量无显著性变化,不同浓度

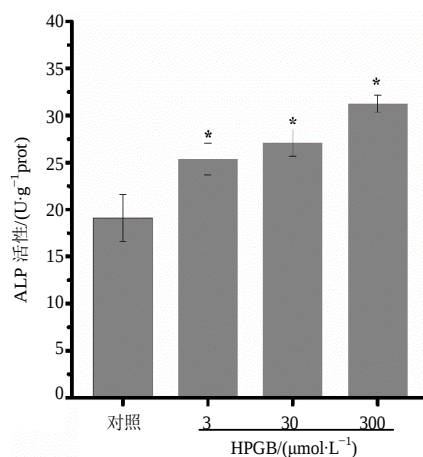
与对照组相比: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

图2 HPGB对MC3T3-E1细胞分化的影响

Fig. 2 Effect of HPGB on differentiation of MC3T3-E1 cells

表2 HPGB对MC3T3-E1细胞DKK-1、OPG、BGP、OPN和RANKL蛋白表达的影响

Table 2 Effects of HPGB on expression of DKK-1, OPG, BGP, OPN and RANKL in MC3T3-E1 cells

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	DKK-1	OPG	BGP	OPN	RANKL	OPG/RANKL
对照	—	2 456±143	0.236±0.09	13 174±1 096	10.21±0.74	10.75±0.82	0.021 9
HPGB	3	2 469±167	0.314±0.05*	14 706±1 477*	17.07±0.91**	10.89±0.68	0.028 8**
	30	2 524±175	0.345±0.06**	15 065±1 026*	18.94±1.58**	10.85±0.75	0.031 7**
	300	2 444±100	0.367±0.07**	15 645 ±1 283*	24.59±0.72**	11.11±1.10	0.033 0**

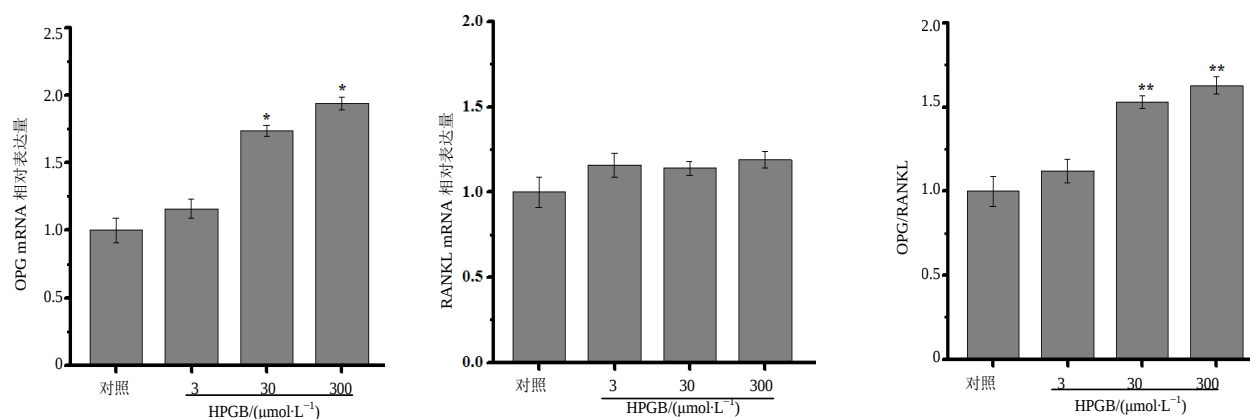
与对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group与对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

图3 HPGB对MC3T3-E1细胞OPG和RANKL mRNA表达水平的影响

Fig. 3 Effect of HPGB on the expression of OPG and RANKL in MC3T3-E1 cells

作为骨组织中骨形成的主要功能细胞,在骨代谢中起着关键性的作用^[12],其在骨的形成过程中经历了增殖、分化和基质钙化这3个阶段,因此研究药物对成骨细胞增殖分化作用的影响,在观察药物的疗效

HPGB(3、30、300 μmol/L)组OPG/RANKL的比值与对照组相比显著性升高($P < 0.01$)。

3.4 HPGB对MC3T3-E1细胞OPG和RANKL mRNA表达水平的影响

实验结果(图3)显示,与对照组相比,不同浓度HPGB(3、30、300 μmol/L)组OPG mRNA表达量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是RANKL mRNA的表达量各组间差异无统计学意义。与对照组相比,RANKL/OPG的比值不同浓度给药组都显著性升高($P < 0.05$)。

4 讨论

正常的骨代谢有赖于成骨细胞所致的骨形成与破骨细胞所致的骨吸收之间的平衡,如果这一平衡被破坏,容易引起骨形成不足或者骨吸收过多,使骨量减少而诱导骨质疏松。研究认为成骨细胞

并探讨其作用途径和机制方面具有深远意义。因此,本实验通过检测细胞增殖、ALP活性以及骨相关基因蛋白的表达水平来研究药物对MC3T3-E1细胞增殖、分化的影响。MTT法结果显示,HPGB对

成骨细胞的增殖具有促进作用。

在侵蚀骨表面的骨形成始于募集成骨细胞前体经历分化成熟为能够分泌胶原的成骨细胞,随后矿化成骨^[13]。ALP是由成骨细胞合成的一种生物大分子,具有催化活性,是早期成骨细胞分化的标志物^[14]。本实验ALP活力测试结果表明,在与药物作用48 h后,异香豆素糖苷HPGB化合物可以促进成骨细胞MC3T3-E1分泌ALP,这表明异香豆素糖苷HPGB化合物可以促进成骨细胞的早期分化从而影响成骨细胞的矿化。BGP也称骨钙蛋白,由成骨细胞特异合成分泌的一种非胶原骨蛋白,测定BGP水平变化,能直接反映成骨细胞活性,是成骨细胞晚期分化的标志^[15]。OPN是由骨基质中成骨细胞和破骨细胞产生的多功能细胞外非胶原基质蛋白,对骨基质的矿化和吸收具有举足轻重作用。悬液芯片的蛋白实验结果显示HPGB可以上调BGP、OPN的蛋白表达,说明异香豆素糖苷HPGB化合物能增强MC3T3-E1细胞晚期分化作用。

近年来研究发现OPG/RANK/RANKL系统在调节骨稳态发挥重要作用^[16-18]。RANKL及其膜结合受体RANK以及其可溶性诱导受体OPG这些都被确定为骨代谢中旁分泌信号传导的候选介质,可以调节细胞的矿化。成骨细胞分泌的OPG可与RANK竞争性地与RANKL结合,从而抑制成熟的破骨细胞的形成^[17]。因此OPG/RANKL的比例维持骨吸收和骨形成动态平衡。Real-time PCR及悬液芯片结果显示异香豆素糖苷HPGB化合物可以上调MC3T3-E1细胞OPG mRNA及蛋白的表达量,而RANKL水平改变较小,但OPG/RANKL比率的明显提高($P<0.01$),从而表明两者不但具有促进骨形成的作用,同时还可能抑制骨吸收。

综上所述,实验结果显示异香豆素糖苷化合物HPGB具有促进成骨细胞MC3T3-E1的增殖、分化,其产生的作用机制与OPG/RANK/RANKL系统有关。可以通过OPG/RANK/RANKL信号通路来调节骨质疏松发生的过程,以此缓解骨质疏松所带的病症,为治疗此疾病提供一定的实验基础。然而,人体是一个复杂的体系,骨代谢受各种激素和因子的影响,药物对骨形成的影响不仅通过其对成骨细胞的直接作用来实现,可能还通过对机体宏观网络的调控来达成,其作用机制也有待进一步研究验证。

参考文献

[1] 严红梅,张振海,孙娥,等. 中药治疗骨质疏松症的研究

进展[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1174-1178.

- [2] 常睿洁. 骨质疏松症的中西药治疗进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(13): 1498-1503.
- [3] 熊燕琴,周筠,雷涛. 骨代谢信号通路的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(2): 200-204.
- [4] 刘晓丹,李春风,谷大海,等. 成骨细胞的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 53-58.
- [5] 李烨,童杰,周衍晶,等. 补肾壮骨中药抗骨质疏松有效成分及其药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1038-1043.
- [6] 黎彦龙,何明,陈秉雄,等. OPG-RANKL-RANK信号系统是调节破骨细胞及骨质疏松症的重要途径[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(24): 3894-3898.
- [7] 郭敏. 香豆素类植物雌激素防治骨质疏松的分子生物学机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2008.
- [8] 张中奇. 海南天料木茎的化学成分及其药理活性研究[D]. 海口: 海南师范大学, 2015.
- [9] 许琼情,时杰,李恒颜,等. 广南天料木茎的抗氧化活性[J]. 精细化工, 2012, 29(1): 30-32, 40.
- [10] 许琼情,刘洋洋,陈德力,等. 天料木属植物化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(21): 1621-1624.
- [11] Wu S Y, Fu Y H, Zhou Q, et al. Bioactive phenolic and isocoumarin glycosides from the stems of homalium paniculiflorum[J]. Molecules, 2018, 23(2): 472.
- [12] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis[J]. Lancet, 2006, 367(9527): 2010-2018.
- [13] 徐练,孔清泉. 调控成骨细胞分化及骨形成关键信号通路的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(12): 1484-1489.
- [14] Eleniste P P, Huang S, Wayakanon K, et al. Osteoblast differentiation and migration are regulated by dynamin GTPase activity[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 46: 9-18.
- [15] Chan B Y, Lau K S, Jiang B, et al. Ethanolic extract of *Actaea racemosa* (black cohosh) potentiates bone nodule formation in MC3T3-E1 preosteoblast cells[J]. Bone, 2008, 43(3): 567-573.
- [16] Ma P, Gu B, Xiong W, et al. Glimepiride promotes osteogenic differentiation in rat osteoblasts via the PI₃K/akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment[J]. PloS One, 2014, 9(11): e112243. DOI: 10.1371/journal.pone.0112243.
- [17] Fujiwara S. Epidemiology of osteoporosis in Japan[J]. J Bone Miner Metab, 2005, 23(S1): 81-83.
- [18] 李应福,李宁,谢兴文. OPG/RANK/RANKL信号轴与原发性骨质疏松关系的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(1): 115-119.