

【药效学评价】

龙牙楸木皂苷IV对原代成骨细胞分化和矿化的影响

李金诚, 燕梦云, 薛帆, 依香叫, 王松月, 周文斌, 裴凌鹏*

中央民族大学民族医药教育部重点实验室, 北京 100081

摘要: 目的 研究龙牙楸木皂苷IV (Tarasaponin IV) 对原代成骨细胞的分化及矿化的影响。方法 通过消化SD乳鼠颅盖骨, 获得原代前成骨细胞, 体外诱导培养并鉴定; 采用MTT比色法检测 Tarasaponin IV (10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用于前成骨细胞的适宜质量浓度范围; 用低、中、高浓度 (0.5、5、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Tarasaponin IV 对成骨细胞进行干预, 培养4 d后, 试剂盒法进行细胞上清中碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定; 培养14 d后, 按茜素红S染色试剂说明对细胞进行钙化结节染色。**结果** 与对照组比较, Tarasaponin IV各浓度组均能明显提高前成骨细胞活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 0~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内细胞生存率呈递增趋势。与对照组比较, Tarasaponin IV低、中、高浓度组细胞上清ALP活性均显著下降 ($P < 0.01$), 中、高浓度组细胞矿化结节数目显著增多 ($P < 0.01$), 且均呈剂量相关性。**结论** Tarasaponin IV可以促进前成骨细胞生长, 增强成骨细胞矿化过程。

关键词: 龙牙楸木皂苷IV; 刺老苞根皮; 原代成骨细胞; 碱性磷酸酶; 矿化

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 03-0427-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.03.008

Effect of Tarasaponin IV on differentiation and mineralization of primary osteoblasts

LI Jincheng, YAN Mengyun, XUE Fan, YI Xiangjiao, WANG Songyue, ZHOU Wenbin, PEI Lingpeng

Key Laboratory of Ethnomedicine, Minzu University of China, Ministry of Education, Beijing 100081, China

Abstract: Objectives To study the influence of Tarasaponin IV on the differentiation and mineralization of primary osteoblasts. **Methods** The craniums of male SD neonatal rats were digested to obtain primary pre-osteoblasts, and cells were then cultured *in vitro* and identified. The suitable concentration range of Tarasaponin IV (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was determined by MTT colorimetry. The osteoblasts were respectively cultured with Tarasaponin IV (0.5, 5, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Alkaline phosphatase (ALP) activity in cell supernatant was determined by kit method after 4 d of culture, and calcified nodules were stained by alizarin red S staining after 14 d of culture. **Results** Compared with the control group, all concentration groups of Tarasaponin IV could significantly increase the activity of osteoblasts ($P < 0.05$, 0.01), and the cell survival rate showed an increasing trend in the concentration range of 0—60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compared with the control group, the ALP activities in the supernatant of Tarasaponin IV low, medium, and high dose groups were decreased significantly ($P < 0.01$), and the number of mineralized nodules in the medium and high concentration groups was increased significantly ($P < 0.01$), in a dose-dependent manner. **Conclusion** Tarasaponin IV can promote the proliferation of pre-osteoblast and enhance the mineralization process of osteoblasts.

Key words: Tarasaponin IV; *Aralia echinocaulis* Hand.-Mazz.; primary osteoblasts; alkaline phosphatase; mineralization

骨质疏松症是一种因骨组织代谢异常引发的疾病, 严重危害着中老年人的身体健康和生活质量。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞, 负责骨基

质的合成、分泌和矿化, 其增殖、分化缺陷是骨质疏松发病的根本原因之一^[1-2]。刺老苞根皮为五加科植物棘茎楸木 *Aralia echinocaulis* Hand.-Mazz. 的根

收稿日期: 2018-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673769、81473451); 中央民族大学硕士研究生自主科研项目 (182150)

第一作者: 李金诚 (1988—), 男, 汉族, 硕士研究生, 从事民族医药学研究。Tel: 18811720108 E-mail: lijincheng176@hotmail.com

*通信作者: 裴凌鹏 (1976—), 男, 汉族, 博士学位, 副研究员, 从事民族医药与临床学研究。Tel: 13520801809 E-mail: lpei@hotmail.com

皮,《滇南本草》载“刺脑包,又名刺老苞、鹊不宿。味苦辛、性凉。入脾、肾二经。治风湿疼、胃疼、跌打损伤。骨折,用鲜根捣碎,酒炒热敷”^[3]。前期研究表明,刺老苞根皮总水提取物可以上调 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin、Wnt-1、Frizzled-2、TCF 的表达,促进成骨细胞增殖、分化和矿化,增强骨形成能力^[4];刺老苞根皮总皂苷可以修复成骨细胞氧化损伤,保护成骨细胞增殖,并且能够对抗泼尼松性骨质疏松大鼠骨损失^[5]。龙牙榧木皂苷 IV (Tarasaponin IV) 为齐墩果烷型三萜皂苷,多含于五加科榧木属植株内^[6]。本课题从刺老苞根皮中分离获得 Tarasaponin IV,并将其用于乳鼠颅盖骨消化诱导的原代成骨细胞干预研究^[7-9],旨在明确 Tarasaponin IV 对成骨细胞的活性效果,为刺老苞根皮临床治疗骨质疏松症提供可靠的基础实验依据。

1 材料

1.1 动物

新生 24 h SD 大鼠乳鼠 10 只,由北京大学医学部(实验动物科学部)提供,实验动物生产许可证号 SCXK-(京)2016-0010。

1.2 药物及主要试剂

刺老苞根皮(湖北恩施中药材有限公司,批号 0P 091101,经北京中医药大学药系杨瑶珺教授鉴定为五加科植物棘茎榧木 *Aralia echinocaulis* Hand.-Mazz. 的根皮);氯仿、乙醇、二氯甲烷、正丁醇、浓硫酸(国药集团);甲醇、乙腈、甲酸(美国 Thermo Scientific 公司); α -MEM 培养基、胎牛血清(FBS)、0.25% 胰蛋白酶溶液(美国 Gibco 公司);青霉素/链霉素(P/S)、II 型胶原酶、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸、茜素红 S 染液、二甲基亚砜(美国 Sigma 公司);磷酸缓冲液(PBS,北京昌盛生物技术有限责任公司);碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒、ALP 活性测定试剂盒(南京建成生物制品有限公司);MTT 细胞增殖及毒性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 主要仪器

柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶 GF-254(青岛海洋化工厂);MCI-GEL 大孔吸附树脂(CHP20/P120)(三菱公司,日本);JA2003 B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司);核磁共振仪(600 MHz)(Varian Vnmrs,美国);高效液相色谱(HPLC)仪(SPD-M20A、ELSD-LT II)、高效液相-离子阱-飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)仪(岛津公司,日本);细胞超净操作台(苏州苏洁净化设备有限公司);CO₂培养箱(Thermo Scientific,美国);L535R-1 低速

冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);MultiSkán 酶标仪(Thermo Scientific,美国);荧光倒置显微镜(Olympus,日本)。

2 方法

2.1 Tarasaponin IV 的制备

取刺老苞根皮 2 kg,经 70% 乙醇加热回流提取 3 次,2 h/次,旋转蒸发浓缩浸膏;加入 200 mL 10% 乙醇溶液稀释;过 MCI-GEL 大孔吸附树脂柱,乙醇(10%~95%)梯度洗脱、分离;收集洗脱液,低温真空干燥成粉末;取 30%~50% 乙醇洗脱样品,用甲醇溶解,60 g 硅胶(100~200 目)拌样,干法装柱;CH₂Cl₂-MeOH 水溶液洗脱,无水甲醇冲柱,依据薄层色谱合并浓缩,获得洗脱样品;乙腈-水溶液(0.01% 甲酸)溶解样品、过滤,湿法过 C₁₈ 柱,不同比例乙腈-水(0.01% 甲酸)梯度洗脱,无水甲醇冲柱,液相图谱合并浓缩。

2.2 原代成骨细胞培养及鉴定

取新生 24 h SD 乳鼠 10 只,用 75% 乙醇浸洗后,在超净操作台内解剖取出颅盖骨,去除其他组织;PBS 清洗;加入 3 mL 消化液 0.25% 胰蛋白酶液:II 型胶原酶溶液(2:1)37 °C 消化 5 min,弃上清液;加入 3 mL 消化液,37 °C 消化 10 min,收集上清液,加 9 mL 完全培养基(89% α -MEM、10% FBS、1% P/S)中和消化,重复消化 4 次,收集液体;离心、吸去上清液,加完全培养基重悬细胞,调整密度,接种于 25 cm² 培养瓶;37 °C、5% CO₂ 培养。取第 3 代前成骨细胞,以 1×10⁵/mL 接种于 24 孔培养板,1 mL/孔;培养 48 h 后,加分化培养基(含 10% FBS、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL 抗坏血酸)诱导,每 2 d 换液 1 次;培养 4 和 14 d,分别进行 ALP 染色和矿化结节染色鉴定。

2.3 细胞活性分析

取第 4 代前成骨细胞,以 2.5×10⁴/mL 接种于 96 孔培养板,200 μ L/孔;培养 48 h 后,加含药培养基干预;实验分组为不含药物的对照组,Tarasaponin IV(10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μ g/mL)组,另设调零孔,每组 3 个复孔;48 h 后,吸去培养液,PBS 清洗细胞 2 次,按 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明检测,即每孔加 90 μ L 新鲜培养液和 10 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h,取出吸去上清,加 110 μ L Formazan 溶解液,低速振荡 10 min,酶联免疫检测仪测定其 490 nm 处各孔吸光度(A)值。

2.4 ALP 活性测定

取第 4 代前成骨细胞,以 1×10⁵/mL 接种于 96 孔培养板,200 μ L/孔;培养 48 h 后,加含药(0.5、5.0、

50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分化培养基(含10% FBS、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸)干预,对照组不含药;2 d后吸取培养液,离心,收集上清液,按ALP活性测试盒说明测定。

2.5 成骨细胞钙化结节染色

取第4代前成骨细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于96孔培养板,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$;培养48 h后,加含Tarasaponin IV(0.5、5.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分化培养基(含10% FBS、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸)干预,对照组不含药;每2 d换液1次;14 d后,吸去培养液,各孔用PBS清洗3次;加10%中性福尔马林,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,固定15 min,蒸馏水冲洗3次;按茜素红S染色试剂说明进行钙化结节染色。

2.6 统计学处理

采用SPSS 18.0软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间采用单因素方差分析,方差齐,采用SNK法检验;方差不齐,采用Dunnett T_3 法检验。

3 结果

3.1 Tarasaponin IV分离与原代成骨细胞鉴定

经液相色谱合并浓缩后,获得化合物I(0.979 g),质量分数为96.979%。HR-MS测得化合物I精确相对分子质量为 m/z 1087.5308,分子式为 $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{23}$; $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定化合物I为Tarasaponin IV,结构式见图1。

细胞培养48 h后,呈三角形、长梭形等形态,分化诱导培养4和14 d后,分别进行ALP染色和茜素红染色,荧光电子显微镜下见灰黑色颗粒状和暗红色钙化结节,经鉴定为成骨细胞。见图2、3。

图1 Tarasaponin IV的化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of Tarasaponin IV

3.2 Tarasaponin IV对前成骨细胞活性的影响

结果如表1所示,与对照组比较,Tarasaponin IV各浓度组干预前成骨细胞24 h后,各浓度组细胞A值均显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 、0.01);Tarasaponin IV在0~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内细胞生存率

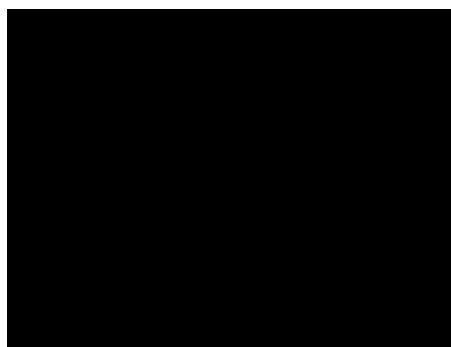


图2 原代成骨细胞ALP染色(40 \times)

Fig. 2 ALP staining of primary osteoblasts (40 \times)

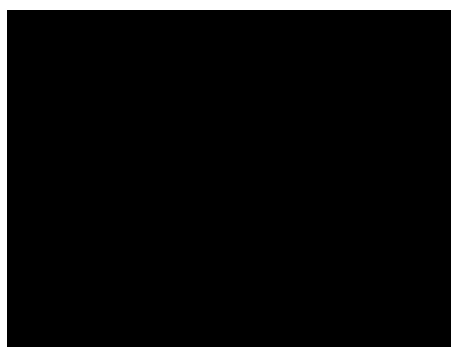


图3 原代成骨细胞矿化结节染色(40 \times)

Fig. 3 Primary osteoblast mineralized nodule staining (40 \times)

表1 Tarasaponin IV对前成骨细胞活性的影响($n = 3$)

Table 1 Effects of Tarasaponin IV on activities of pre-osteoblasts ($n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A_{490}	生存率/%
对照	—	0.143 \pm 0.002	100.000
Tarasaponin IV	10	0.160 \pm 0.004	120.968
	20	0.198 \pm 0.001**	166.532
	30	0.231 \pm 0.011*	206.452
	40	0.208 \pm 0.005**	179.032
	50	0.216 \pm 0.023	188.306
	60	0.224 \pm 0.003**	197.984
	70	0.188 \pm 0.002**	155.242
	80	0.197 \pm 0.006*	166.129
	90	0.187 \pm 0.002**	153.226
	100	0.183 \pm 0.003**	148.790

与对照组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

呈递增趋势,在60~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内细胞生存率呈逐渐递减趋势,选取0~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 研究Tarasaponin IV对成骨细胞分化和矿化的影响。

3.3 Tarasaponin IV对成骨细胞ALP活性的影响

结果如表2所示,与对照组比较,Tarasaponin IV干预成骨细胞2 d后,各质量浓度(0.5、5、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

表2 Tarasaponin IV对成骨细胞ALP活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2 Effect of Tarasaponin IV on ALP activity of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	ALP活性/ ($10 \times$ 金氏单位 $\cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	0.784 \pm 0.007
Tarasaponin IV	0.5	0.647 \pm 0.002**
	5.0	0.589 \pm 0.010**
	50.0	0.583 \pm 0.002**

与对照组比较:** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

组ALP活性均显著下降,且随质量浓度增加而呈递减趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,Tarasaponin IV可以通过降低ALP活性,影响成骨细胞的分化过程。

3.4 Tarasaponin IV对成骨细胞钙化结节形成的影响

结果如图4、表3所示,与对照组比较,Tarasaponin IV干预成骨细胞14 d后,各浓度组(0.5、5.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)钙化结节数目增加,且随浓度增加而呈递增趋势;其中,中、高浓度组(5、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)钙化结节数目明显高于对照组,差

异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,Tarasaponin IV可以通过促进成骨细胞钙化结节的形成,增强骨基质矿化。

4 讨论

骨质疏松症以骨量减少、骨微结构退变、骨脆性增加和骨强度降低为特征,多发于膝、腕部关节及腰椎等部位。骨质疏松症基金会主持的一项最新研究显示,中国骨质疏松的总患病率为6.6%~19.3%,平均为13%^[9]。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,由间充质祖细胞(即软骨祖细胞)分化产生^[10],其胞浆膜上分泌的ALP(同型二聚体糖蛋白)是成骨细胞早期分化的指标,调节骨基质的成熟稳定,是矿化的先决条件,而矿化是成骨细胞分化的最后阶段,也是成骨细胞体外成骨的早期标志。当成骨细胞数量不足或活性功能低下时,可打破骨形成与骨吸收之间的动态平衡,加速骨质疏松症的形成^[11-12]。

刺老苞根皮为土家族医师临床治疗骨伤的常用药,《闽东本草》载其“性温,味微咸,入肝、心、肾三经,补腰肾、壮筋骨、舒筋活血、散瘀止痛。治跌打损伤,鲜榕木皮,捣烂敷患处”^[13]。临床数据表明,刺老苞根皮具有修复骨损伤的功能,例如乌日图等^[14]发现刺老苞根皮能减轻膝关节骨性关节炎

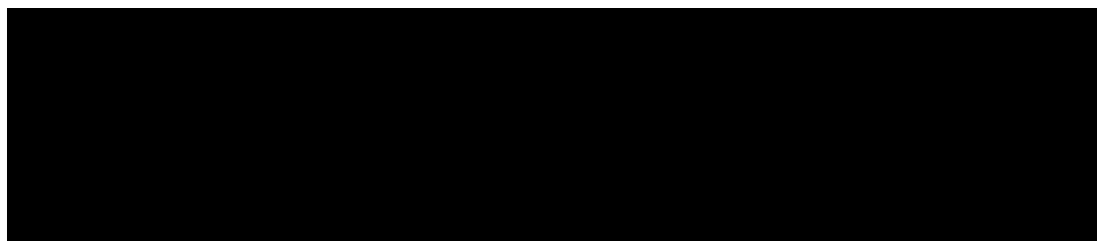


图4 Tarasaponin IV干预成骨细胞矿化染色(20 \times)

Fig. 4 Mineralized nodule staining of primary osteoblasts (20 \times)

表3 Tarasaponin IV对成骨细胞钙化结节形成的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effects of Tarasaponin IV on formation of calcified nodules in osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	矿化结节数目
对照	—	11.333 \pm 2.517
Tarasaponin IV	0.5	24.333 \pm 6.429
	5.0	48.667 \pm 11.676**
	50.0	66.667 \pm 18.037**

与对照组比较:** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

患者局部症状,恢复关节功能。现代化学研究表明,刺老苞根皮中含有较多的总多糖、总皂苷和总黄酮,含量占比分别为7.33%、3.28%、0.92%^[15]。前期研究发现,刺老苞根皮总水提物有促进骨形成,提高骨矿物质水平与骨密度值的作用;总皂苷可以修复成骨细胞氧化损伤,保护成骨细胞增殖,促进骨形成,并且能够对抗泼尼松性骨质疏松大鼠骨损失^[4-5]。

本实验通过70%乙醇回流提取刺老苞根皮,10%乙醇稀释过柱,30%~50%乙醇梯度洗脱,低温干燥,过硅胶柱,CH₂Cl₂-MeOH梯度洗脱,乙腈-水溶(0.01%甲酸)梯度洗脱,液相图谱合并浓缩,获得

三萜皂苷化合物 Tarasaponin IV。有研究表明 Tarasaponin IV对心肌细胞缺氧/复氧损伤有明显的保护作用^[16],但对成骨细胞活性的研究尚未见报道。本实验将 Tarasaponin IV用于原代成骨细胞的干预研究,分析不同浓度 Tarasaponin IV对原代成骨细胞分化和矿化的影响。结果表明,原代成骨细胞经 Tarasaponin IV不同浓度组干预后,细胞生存率明显高于对照组,ALP活性下降,矿化结节数目显著增多。分析原因为 Tarasaponin IV可以通过促进前成骨细胞的生长,增加对ALP的需求量,致使ALP利用率升高,促进成骨细胞矿化结节形成,提高骨基质的矿化效果。

Tarasaponin IV能够促进原代成骨细胞增殖和矿化功能,可以为刺老苞根皮临床防治骨质疏松症提供药理学实验参考,但 Tarasaponin IV作用成骨分化的分子机制尚不明确,仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Liu Z, Weaver J, de Papp A, et al. Disparities in osteoporosis treatments[J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(2): 509-519.
- [2] Marie P J, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets [J]. *Eur J Endocrinol*, 2011, 165(1): 1-10.
- [3] 兰茂. 滇南本草 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2004.
- [4] 依香叫, 李金诚, 王松月, 等. 刺老苞根皮含药血清对原代成骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(14): 2749-2753.
- [5] 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, 22(6): 43-46.
- [6] Jonason J H, O'Keefe R J. Isolation and culture of neonatal mouse calvarial osteoblasts [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1130: 295-305.
- [7] Marzia M, Sims N A, Voit S, et al. Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(2): 311-320.
- [8] Malavasi M, Louro R, Barros M B, et al. Effects of risedronate on osteoblastic cell cultures [J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 68: 43-47.
- [9] 李冲, 吕伟华, 王亭亭, 等. 1088 例医务人员骨质疏松的流行病学研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(10): 1217-1220.
- [10] Rosen C J. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism [M]. Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. DOI: 10.1002/9781118453926.
- [11] Liu Y, Lin Z, Guo J, et al. Notoginsenoside R1 significantly promotes *in vitro* osteoblastogenesis [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 537-544.
- [12] Kono R, Okuno Y, Inada K, et al. A Prunus mume extract stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(10): 1907-1911.
- [13] 江苏新医学院. 中药大辞典-上册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [14] 乌日图, 付准, 郑玲玲, 等. 刺老苞胶囊治疗膝关节骨性关节炎疗效观察 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(5): 224-226.
- [15] 裴凌鹏, 尹霞, 刘伟志. 刺老苞根皮总黄酮及微量元素含量的分析研究 [J]. *微量元素与健康研究*, 2009, 26(4): 14-16.
- [16] 杨明华, 刘影, 王敏, 等. 龙牙榧木皂苷IV对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 [J]. *中国科技论文在线精品论文*, 2016, 9(11): 1115-1120.