

黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞的影响及其机制研究

孔祥鹤¹, 牛银波¹, 王婷梅¹, 王娟¹, 梅其炳^{1,2*}

1. 西北工业大学生命学院, 陕西 西安 710072

2. 第四军医大学 药理教研室, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 研究黄芪多糖对体外培养大鼠原代成骨细胞增殖、分化及矿化的影响及其作用机制。方法 体外培养的新生SD大鼠颅骨原代成骨细胞体系中分别加入不同质量浓度(0.1、0.3、1、3、10、30、100 $\mu\text{g/mL}$)的黄芪多糖, 24、48 h后MTT法检测细胞增殖, 碱性磷酸酶(AKP)活性检测法检测细胞分化, 茜素红染色法观察黄芪多糖10 $\mu\text{g/mL}$ 对细胞矿化的影响, Western blotting法检测黄芪多糖1、10 $\mu\text{g/mL}$ 作用于细胞24 h后, 对细胞中骨形成蛋白(BMP-2)的表达、MAPK信号通路中关键蛋白ERK、P38、p-ERK、p-P38等表达的影响。结果 黄芪多糖能剂量相关地促进大鼠原代成骨细胞的增殖、分化及矿化, 同时上调BMP-2、p-ERK、p-P38蛋白的表达, 提高p-ERK/ERK、p-P38/P38值。结论 黄芪多糖可通过促进BMP-2的表达、上调其下游的ERK MAPK和P38 MAPK的磷酸化水平来促进成骨细胞增殖、分化。

关键词: 黄芪多糖; 原代成骨细胞; 增殖; 分化; 矿化; BMP-2; MAPK

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2065-05

Effect of *Astragalus* polysaccharides on rat primary osteoblast and its mechanism

KONG Xiang-he¹, NIU Yin-bo¹, WANG Ting-mei¹, WANG Juan¹, MEI Qi-bing^{1,2}

1. School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

2. Department of Pharmacology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Key words: *Astragalus* polysaccharides; primary osteoblast; proliferation; differentiation; mineralization; BMP-2; MAPK

骨质疏松症是一种全身性的骨骼老化或废用退化相关的代谢障碍性疾病, 其防治主要从促骨形成与抑骨吸收两方面入手。研究表明, 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)对胚胎骨形成及出生后成骨有重要作用, 在体外能诱导成骨细胞分化。BMP-2是最主要的骨形成调控因子, 通过一系列信号转导途径, 其中包括较为重要的促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径发挥骨形成诱导作用。有研究表明MAPK家族中的细胞外调节激酶(extracellular-regulated kinase, ERK)途径、p38途径是参与成骨细胞增殖与分化的重要信号通路^[1-2]。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根, 具有补气健脾、利尿托毒等功效,

《神农本草经》将其列为上品。中医临床常用含有黄芪的方剂、黄芪水煎液等治疗骨质疏松症^[3], 然而对其抗骨质疏松症作用的活性部位、作用机制尚不清楚。黄芪多糖是黄芪的主要活性成分之一, 具有免疫调节、保护心肌、降血糖、延缓衰老等多种药理作用^[4-7]。因此本实验研究黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞增殖、分化及矿化能力的影响, 探讨其是否影响BMP-2、MAPK信号通路相关蛋白的表达, 以揭示黄芪抗骨质疏松症作用的有效部位及作用机制, 为深入研究黄芪防治骨质疏松提供理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

黄芪多糖(质量分数98%, 陕西森弗生物技术有限公司), DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司), 胎牛血清(杭州四季青生物制剂公司), 雌二醇(E₂)、胰蛋白酶、I型胶原酶、EDTA、二甲基

收稿日期: 2010-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073037); 国家“863”计划(2008AA12A220); 西北工业大学博士论文创新基金(cx201024)

作者简介: 孔祥鹤(1983—), 女, 云南大理人, 博士研究生, 主要从事骨质疏松及其防治的研究。E-mail: kongxianghe@126.com

*通讯作者 梅其炳 Tel: (029)84779212 E-mail: qbmei@npu.edu.cn

亚砷、MTT、茜素红、西吡氯铵(美国 Sigma 公司);碱性磷酸酶(AKP)试剂盒(南京建成生物工程研究所),BMP-2、p-ERK、ERK、p-P38、P38、 β -actin 抗体(美国 Bio World 公司)。

1.2 动物

新生(1~3 d) SPF 级 SD 大鼠,购自第四军医大学实验动物中心,合格证号 SCXK(军)2007-007。

1.3 仪器

倒置显微镜(日本 Olympus 公司),Bio-Rad Model 680 酶标仪(美国),CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司),DU800 型分光光度计(美国 Beckman 公司),培养板(丹麦 Nunclon 公司),高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司),PAC300 型电泳仪(美国 Bio-Rad 产品)。

2 方法

2.1 细胞的分离与培养

取4只出生1~2 d的SD乳鼠,用75%乙醇溶液浸泡消毒5 min后置无菌培养皿中,取颅盖骨放入PBS缓冲液中洗3次,去除骨膜及周围结缔组织。将骨片浸于胰酶-I型胶原酶液(1:4)中,剪成3 mm×3 mm大小,于5% CO₂、37℃条件下培养箱中恒温消化30 min,其间每5 min振荡1次,用含15%胎牛血清的DMEM培养液终止胰酶消化,加入I型胶原酶1 mg/mL,再将骨剪成约1 mm²大小,于37℃、恒温消化40 min,其间每5 min振荡1次,加入含15%胎牛血清的DMEM培养液终止消化,1 000 r/min离心5 min以沉淀细胞,弃去消化液。用含15%胎牛血清的DMEM培养液重悬细胞后接种于细胞培养瓶中,置于培养箱中30 min后成纤维细胞先贴壁,吸取含成骨细胞的上清液于另一培养瓶中继续培养,重复胶原酶消化过程1次,2 d后换液,以除去未贴壁的细胞。原代细胞长满瓶壁后,进行传代,细胞传至第2代时换用含10%胎牛血清的DMEM培养液继续培养。传代3次后,可使细胞得到纯化,经AKP检测和茜素红染色鉴定获得的细胞为成骨细胞。

2.2 MTT法检测成骨细胞增殖

取对数生长期的第3代成骨细胞,以 5×10^3 /孔密度接种于96孔板,置培养箱中于37℃、5% CO₂贴壁培养12 h,黄芪多糖组分别给予黄芪多糖(用10%血清培养液配制)0.1、0.3、1、3、10、30、100 μ g/mL,对照组给予10%血清培养液,不加细胞,用于调零,E₂组给予E₂ 1×10^{-9} mol/L。将96孔板

置于培养箱中分别继续培养24、48 h,每孔加入5 g/L MTT 20 μ L,继续孵育4 h后终止培养,吸弃孔内上清液,每孔加入DMSO 150 μ L,室温振荡10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪检测570 nm波长处各孔吸光度(A)值。

2.3 AKP活性检测法检测成骨细胞分化

取对数生长期的第3代成骨细胞,以 1×10^5 /孔密度接种于24孔板中贴壁培养12 h,分组与给药同“2.2”项。分别于24、48 h后,按照AKP试剂盒说明书进行操作,采用分光光度计测定各组520 nm处A值,计算AKP活性。

2.4 茜素红染色法检测成骨细胞矿化

将成骨细胞按 2×10^5 /孔密度接种于24孔板,12 h贴壁后更换含黄芪多糖10 μ g/mL的培养液,并设对照组。在细胞培养箱中每3 d换液1次,连续培养21 d后弃去培养液,PBS清洗3次,95%的乙醇固定1 h,蒸馏水清洗3次,加入40 mmol/L茜素红(pH 4.2)染液,于37℃培养15 min,再用蒸馏水清洗3次,在显微镜下观察矿化结节并照相。然后加入100 mmol/L西吡氯铵溶液,室温放置1 h,使与钙结合的茜素红充分溶解,用酶标仪检测570 nm处溶液A值,对矿化结节进行量化^[8]。

2.5 Western blotting法检测BMP-2、ERK、P38蛋白表达

取对数生长期的第5代成骨细胞,以 5×10^5 /孔密度接种于6孔板中贴壁培养12 h,根据前面实验结果选择两个较适质量浓度(1、10 μ g/mL)的黄芪多糖给药,并设对照组。24 h后用细胞刮刮下并收集细胞,加入RI-PA(含PMSF蛋白酶抑制剂)细胞裂解液提取总蛋白,用酶标仪进行蛋白定量。蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,将膜浸泡在5%脱脂牛奶中4℃封闭过夜,依次加兔抗BMP-2、p-ERK、ERK、p-P38、P38、 β -actin,一抗4℃培养8 h,PBST洗膜后加二抗,室温培养1 h,用PBST及PBS洗膜后,进行化学发光,将条带进行灰度分析以观察各蛋白表达水平的变化。

2.6 统计学处理

实验数据采用SPSS 11.0统计软件中的方差分析(ANOVA)进行统计,Western blotting条带用Quantity One 4.6.2软件进行灰度值定量分析。

3 结果

3.1 对原代成骨细胞增殖的影响

MTT法检测结果显示,与对照组相比,黄芪多

糖 0.3、1、3、10、30、100 $\mu\text{g/mL}$ 作用于原代成骨细胞 24、48 h 后, 均能剂量相关地促进细胞增殖 ($P<0.05$ 、 0.01), 30 $\mu\text{g/mL}$ 时作用最强, 在 48 h 时的作用强于 24 h; E_2 的细胞增殖促进作用强于黄芪多糖。结果见图 1。

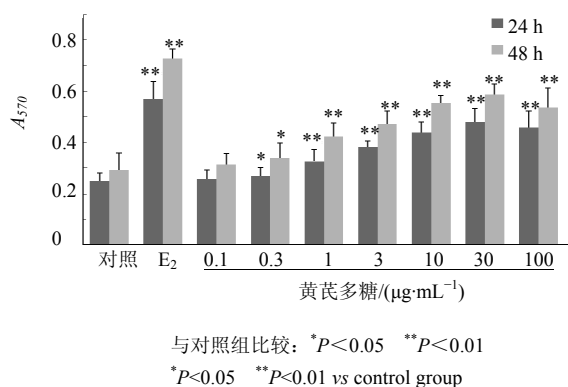


图 1 黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of *Astragalus* polysaccharides on proliferation of rat primary osteoblast ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 对原代成骨细胞 AKP 活性的影响

黄芪多糖 1、3、10、30、100 $\mu\text{g/mL}$ 时作用 24 h, 原代成骨细胞的 AKP 活性高于对照组; 作用 48 h 后, 黄芪多糖 0.3、1、3、10、30、100 $\mu\text{g/mL}$ 组原代成骨细胞的 AKP 活性均显著高于对照组 ($P<0.05$ 、 0.01); 10 $\mu\text{g/mL}$ 时的作用最强, 48 h 时的作用强于 24 h, 且均呈质量浓度相关性变化。 E_2 对原代成骨细胞分化的促进作用强于黄芪多糖。结果见图 2。

3.3 对原代成骨细胞矿化的影响

各组细胞连续培养 21 d, 在不同时间内出现肉眼可见的白色结节。茜素红染色后细胞呈现大小、形态不一的红色阳性结节, 镜检和茜素红量化结果

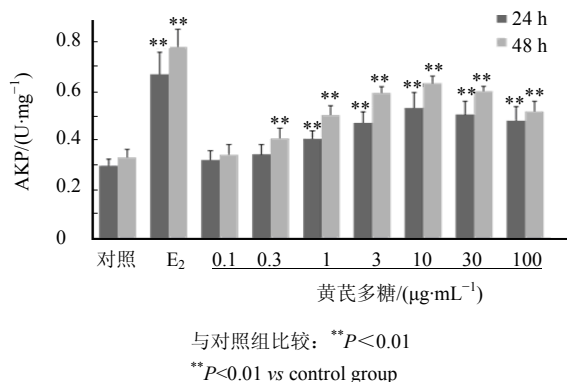


图 2 黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞 AKP 活性的影响
($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of *Astragalus* polysaccharides on AKP activity of rat primary osteoblast ($\bar{x} \pm s, n=6$)

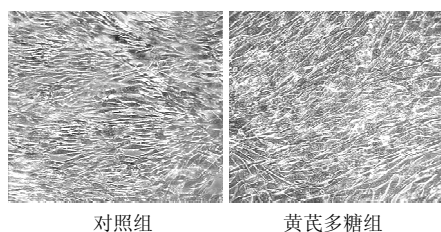
显示, 与对照组相比, 黄芪多糖 10 $\mu\text{g/mL}$ 显著增加成骨细胞矿化结节的数量。结果见图 3。

3.4 对原代成骨细胞 BMP-2、P38、ERK 蛋白表达的影响

在原代成骨细胞中加入质量浓度为 1、10 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芪多糖培养 24 h 后, 黄芪多糖不仅能使 BMP-2 蛋白表达升高, 而且能使 MAPK 通路中的磷酸化 p-ERK、p-P38 蛋白表达升高, 且呈质量浓度相关性变化, 而总的 ERK、P38 蛋白水平则无明显改变, 因此 p-ERK/ERK、p-P38/P38 值升高。结果见图 4。

4 讨论

现有的抗骨质疏松化学药作用靶点较单一, 长期使用有一定的不良反应, 因此发掘安全有效、适合长期使用的防治药物已成为抗骨质疏松症研究的重要内容。骨质疏松症归属于中医骨痿、骨枯、骨痹范畴, 中医临床上采用补肾壮骨、健脾益气、活血养肝等措施防治骨质疏松症。长期的临床实践发



与对照组比较: ** $P<0.01$
** $P<0.01$ vs control group

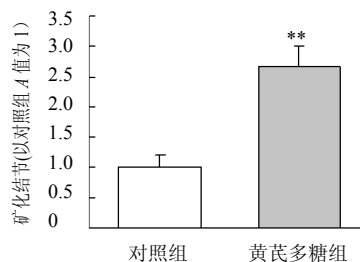


图 3 黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞矿化结节的影响 ($n=6$)

Fig. 3 Effect of *Astragalus* polysaccharides on mineralization of rat primary osteoblast ($n=6$)

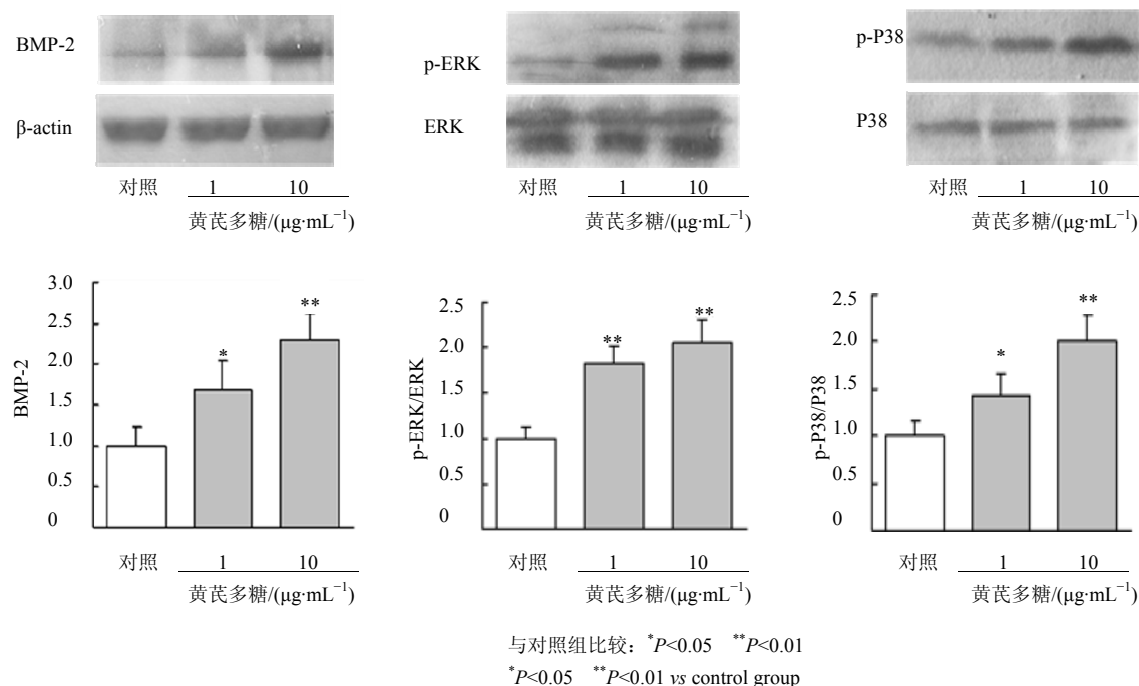


图 4 黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞 BMP-2、ERK 和 P38 蛋白表达水平的影响 ($n=4$)

Fig. 4 Effect of *Astragalus* polysaccharides on protein expression level of BMP-2, ERK, and P38 in rat primary osteoblast ($n=4$)

现了包括黄芪在内的许多疗效确切、不良反应少、可长期使用的中药^[9]。黄芪多糖是黄芪的主要活性成分之一,邹丽宜等^[10]发现黄芪多糖能预防肝纤维化小鼠骨丢失,提示黄芪多糖可能是中药黄芪抗骨丢失的有效部位之一。本实验探讨黄芪多糖对成骨细胞增殖、分化的影响,从细胞水平考察黄芪多糖的活性。

成骨细胞不仅决定骨形成,同时也调节破骨细胞的骨吸收,是骨代谢的重要功能细胞。骨质疏松病理机制的一个重要方面就是成骨细胞的增殖、分化受到抑制,从而使骨质量和骨量下降,骨小梁稀疏、断裂。因此防治骨质疏松的关键是提高成骨细胞的增殖和分化水平。AKP 是参与骨代谢的重要蛋白质,是识别和评价成骨细胞分化程度的早期指标。在预实验中,黄芪多糖 0.01、0.1、1、10、100、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别作用于原代成骨细胞,发现其在 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均有促进细胞增殖作用,其中 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的作用与质量浓度呈正相关,10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用降低,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时则抑制细胞增殖,因此最终选择 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于实验。在此质量浓度范围内,黄芪多糖能质量浓度相关地促进细胞增殖和分化,其中 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的作用较强,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促分化作用较强。黄芪多糖对成骨细胞增殖、分化的

促进作用虽弱于雌激素,但雌激素对子宫具有明显的刺激作用^[11],而黄芪多糖明显的不良反应尚未见报道。

成骨细胞是促进骨矿化的主要细胞,矿化结节的形成是成骨细胞体外成骨的重要标志之一,是成骨功能的形态表现^[12]。在本实验中,黄芪多糖 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用于成骨细胞,能显著促进矿化结节的形成,从细胞水平证实黄芪多糖具有促骨形成作用。

骨形态发生蛋白系列 (BMPs) 属于转化生长因子- β (TGF- β) 超家族,其主要生物学作用是诱导未分化的间充质细胞增殖及发生成骨性分化,是调节成骨细胞生长最重要的生长因子,其中以 BMP-2 活性最强,对人骨髓间充质干细胞有强烈的成骨诱导活性,而且能使诱导性骨细胞向确定性骨细胞转化,从而促进骨形成^[13]。在本实验中发现,黄芪多糖能剂量相关地促进大鼠原代成骨细胞 BMP-2 蛋白表达,提示黄芪多糖促成骨细胞增殖、分化的作用机制与其上调骨形成蛋白 BMP-2 的表达水平密切相关。

BMP 受体属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶跨膜受体,可分为 I 型和 II 型。当 BMP 配体与 I 型或 II 型受体组成的同源二聚体结合后,MAPK 通路则被激活^[14]。MAPK 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,

MAPK 信号通路参与细胞生长、发育、分裂以及细胞间功能的协调等多种生理过程。研究表明, MAPK 中的 ERK (细胞外相关信号蛋白激酶)、MAPK、p38 MAPK 参与了成骨细胞增殖分化的信号转导过程^[1-2]。MAPK 通路通过磷酸化级联反应激活, ERK 通过 Ras→Raf (MAPKKK)→ERK1/2 (MAPKK)→ERK (MAPK) 被激活, P38 则通过 TAK (MAPKKK)→MKK3/6 (MAPKK)→P38 (MAPK) 被激活。活化(磷酸化)的 MAPK 将信号转导到转入核内, 促使 c-fos、c-myc、c-jun 及成骨细胞特异性转录因子 Osf2/Cbfa1 等多种转录因子的激活, 最终促进细胞的增殖与分化, 而且对成骨细胞的粘附、伸展、位移及整合素的表达均具有重要意义^[15]。本实验中, 黄芪多糖不仅能使 BMP-2 蛋白表达升高, 而且能使 MAPK 通路中的 p-ERK/ERK、p-P38/P38 值升高, 即促进 ERK MAPK 和 P38 MAPK 的磷酸化。

综上所述, 黄芪多糖能促进大鼠原代成骨细胞的增殖、分化与矿化, 证实了该有效部位的促成骨活性。其可能的机制是通过上调骨形成蛋白 BMP-2 的表达, 激活下游的 MAPK 信号通路, 促进 ERK 和 P38 的磷酸化, 最终促进细胞的增殖、分化。

参考文献

- [1] Lai C F, Chaudhary L, Fausto A, *et al.* Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (17): 14443-14450.
- [2] Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, *et al.* Evidence for a role of P38 MAPKinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation [J]. *Bone*, 2002, 30 (1): 91-98.
- [3] 单俊杰, 王顺春, 刘 涤, 等. 黄芪多糖的化学和药理研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14 (3): 61-64.
- [4] 周军杰, 曹成福, 纪 斌, 等. 丹黄补骨方调控骨形成成功的疗效特征 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 37-39.
- [5] 苏旭春, 梁傍顺, 郭晓东, 等. 黄芪多糖对化疗后气虚正患者青紫舌的改善作用 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 106-108.
- [6] 金 璋, 沈 洁. 注射用黄芪多糖对 II-III 期非小细胞肺癌放疗患者免疫功能的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 611-612.
- [7] 阳 波, 杨 静. 黄芪对绝经后骨质疏松症患者影响的临床研究 [J]. 四川医学, 2007, 28 (3): 291-292.
- [8] Yang R S, Lin W L, Chen Y Z, *et al.* Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts [J]. *Bone*, 2005, 36(2): 276-283.
- [9] 王 婷, 张金超, 杨梦甦, 等. 抗骨质疏松症的单味中药及药用植物研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (9): 718-721.
- [10] 邹丽宜, 吴 铁, 崔 燎. 黄芪多糖对肝纤维化小鼠骨丢失的防治作用 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12 (2): 95-98.
- [11] Rossouw J E, Anderson G L, Prentice R L, *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy post-menopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial [J]. *J Am Med Assoc*, 2002, 288(3): 321-333..
- [12] Lynch M P, Capparelli C, Stein J L, *et al.* Apoptosis during bone-like tissue development *in vitro* [J]. *J Cell Biochem*, 1998, 68(1): 31-49.
- [13] Troen B R. Molecular mechanisms underlying osteoblast formation and activation [J]. *Exp Gerontol*, 2003, 38(6): 605-614.
- [14] Sakon T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches [J]. *Bone*, 1998, 22(6): 591.
- [15] 端木德强, 李中海, 王敬泽. MAPK 信号通路研究进展 [J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24 (3): 151-154.