

天山雪莲愈伤组织提取物对人成骨肉瘤细胞 MG-63 增殖及分化的影响

王南¹, 唐琴¹, 姬芳玲¹, 许青^{2*}, 包永明^{1*}

1. 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

2. 沈阳师范大学粮食学院, 辽宁 沈阳 110034

摘要: **目的** 研究天山雪莲愈伤组织提取物 (extract from callus of *Saussurea involucrate*, ESI) 对人成骨肉瘤细胞 MG-63 增殖及分化的影响, 探讨 ESI 抗骨质疏松的作用及机制。 **方法** 以 MG-63 为研究对象, 采用 MTT 法和乳酸脱氢酶 (LDH) 法检测 ESI 对成骨细胞增殖的影响, 相关试剂盒检测碱性磷酸酶 (ALP) 活性和羟脯氨酸 (Hyp) 水平, 茜素红染色法观察对矿化骨结节形成的影响; 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测骨保护素 (OPG) 和核因子- κ B 活化因子受体配体 (RANKL) 基因表达水平; Western blotting 法检测 OPG/RANKL 蛋白水平; 检测 p38 特异性抑制剂 SB203580 对 ESI 作用于成骨细胞增殖、分化、矿化以及 OPG/RANKL 表达的影响。 **结果** ESI 低于 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对成骨细胞无细胞毒性, 31.25、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对成骨细胞生长有促进作用; ESI 显著提高 ALP 活性、Hyp 水平以及矿化骨结节形成; 显著上调 MG-63 细胞 OPG mRNA 水平, 下调 RANKL mRNA 水平, 上调 OPG/RANKL 蛋白水平; SB203580 显著抑制 ESI 对成骨细胞增殖、ALP 活性、矿化骨结节形成的促进作用以及对胶原蛋白积累量和 OPG/RANKL 值的提高作用。 **结论** ESI 能够促进成骨细胞增殖、分化和矿化, 其机制可能与调节 OPG 和 RANKL 基因表达有关, 并且可能通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路进行信号转导。

关键词: 天山雪莲; 愈伤组织; 成骨细胞; I 型胶原蛋白; 骨保护素; 核因子- κ B 活化因子受体配体; p38 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)19-2900-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.014

Effect of extract from callus of *Saussurea involucrate* on proliferation and differentiation of osteosarcoma cell MG-63

WANG Nan¹, TANG Qin¹, JI Fang-ling¹, XU Qing², BAO Yong-ming¹

1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

2. College of Grain Science and Technology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China

Abstract: Objective To investigate the effect of extract from callus of *Saussurea involucrate* (ESI) on the proliferation and differentiation of osteosarcoma cells MG-63 and explore its anti-osteoporosis and mechanism. **Methods** Using human osteosarcoma cells MG-63 for the study, the effect of ESI on the proliferation was detected by MTT and LDH methods; The activity of alkaline phosphatase activity (ALP) and the level of hydroxyproline (Hyp) were investigated by related reagent kit; The effect of ESI on mineralized nodules was observed by Alizarin red staining and quantified by CPC, the expression of OPG/RANKL was measured by RT-PCR and Western blotting, and the proliferation, differentiation, mineralization, and OPG/RANKL expression levels of MG-63 were assayed when medium contains both p38 inhibitor SB203580 and ESI. **Results** MTT and LDH assay showed that ESI (< 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was non-toxic to MG-63, and it promoted the proliferation at the concentration of 31.25 and 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ESI could significantly increase the ALP activity, Hyp content, and amount of mineralized nodules; At the mRNA level, ESI could significantly up-regulate OPG expression and down-regulate RANKL expression; At the protein level, ESI could significantly increase the ratio of OPG/RANKL; SB203580 could reverse the acceleration of ESI on the proliferation, differentiation, mineralization, and OPG/RANKL expression of MG-63. **Conclusion** ESI has the facilitating effect on the osteoblast proliferation, differentiation, and mineralization; The mechanism may be associated with the expression of OPG and RANKL, as well as the signal transduction pathway of p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK).

Key words: *Saussurea involucrate* (Kar. et Kir.) Sch. -Bip.; callus; osteoblast; type I collagen protein; osteoprotegerin; RANKL; p38 MAPK

收稿日期: 2015-01-15

作者简介: 王南 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为药物化学与药理学。Tel: 18941411788 E-mail: dlutwangnan@hotmail.com

*通信作者 包永明 (1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为蛋白质及酶工程、生物催化与转化、药物化学及药理。

Tel: (0411)84706344 E-mail: biosci@dlut.edu.cn

许青 (1964—), 女, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: xuqcqm@126.com

天山雪莲 *Saussurea involucrata* (Kar. et Kir.) Sch. -Bip. 是我国稀有的传统名贵药材, 具有补肾活血、强筋骨、温肾助阳等功效^[1]。由于天山雪莲野生资源十分有限, 其人工培育意义重大。李燕^[2]采用植物细胞培养的方法, 选取天山雪莲离体组织通过脱分化形成的愈伤组织作为继代种子, 给予一定条件进行继代培养而获得较大愈伤组织团块, 其化学成分与野生天山雪莲成分相似, 有效成分主要为黄酮类化合物和多糖。但关于天山雪莲愈伤组织的药理作用研究尚未见报道。

成骨细胞是承担骨重建的一类重要细胞, 对维持正常骨转换具有重要意义^[3]。老年骨质疏松症主要病理机制是成骨细胞的骨形成能力下降, 从而导致骨量低下、骨微结构损害、骨脆性增加, 甚至发生骨折^[4-6]。用于骨质疏松研究的模型包括动物模型和细胞模型, 与动物模型比较, 细胞模型由于样品均一、可控性强、重复性好、通量高等特点, 广泛应用于药物筛选、活性评价等诸多研究; 目前, 用于骨质疏松研究的主要细胞系有小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1、大鼠成骨肉瘤细胞 UMR-106、ROS17/2.8 和人成骨肉瘤细胞 HOS TE85、MG-63、SaOS-2 等, 用于考察成骨细胞增殖、分化能力以及功能表达。

MG-63 来源于人成骨肉瘤细胞, 不仅具有成骨细胞的特点, 容易培养, 而且与人成骨细胞同源性更高。因而, 本实验以 MG-63 为对象, 探讨天山雪莲愈伤组织提取物 (extract from callus of *Saussurea involucrata*, ESI) 对成骨细胞增殖、发育的影响及作用机制, 在细胞水平上为天山雪莲在抗骨质疏松的药效学方面提供实验及理论依据, 为 ESI 的应用及开发提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

人成骨肉瘤细胞 MG-63 (KG231) 购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 试剂

DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS), 美国 Gibco-BRL 生命技术有限公司; 噻唑蓝 (MTT), 美国 Invitrogen 有限公司; 西吡氯铵 (CPC)、茜素红-S (ARS)、二甲基亚砷 (DMSO), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH)、4-羟脯氨酸 (Hyp) 试剂盒, 南京建成生物技术有限公司; 抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠,

北京索莱宝科技有限公司; Trizol 试剂、琼脂糖, 美国 Invitrogen 有限公司; Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H), 2641Q, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 各种引物合成、实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 中使用的酶, 华大基因; p38 特异性抑制剂 SB203580, 碧云天生物技术研究。

1.3 药物

ESI 由大连普瑞康生物技术有限公司提供。提取方法: 雪莲培养物干燥粉末中加入 30% 乙醇溶液, 固液比为 1:15, 超声提取, 温度为 85 °C, 每次提取 60 min, 连续提取 2 次, 合并 2 次所得液体, 60 °C 减压浓缩获得实验样品。以芦丁作为对照品, 分光光度计法检测 500 nm 波长下吸光度值, 计算总黄酮质量浓度, 结果 ESI 中含总黄酮为 6.1%, ESI 使用时用培养基稀释。

1.4 仪器

SX-500 高压蒸气灭菌锅, 日本 TOMY 公司; 垂直层流洁净工作台, 上海净化设备有限公司; MAXI dry lyo 真空冷冻干燥机, 丹麦 Heto 公司; Hera cell 150 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司; IX71 荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; Biofuge Stratos 冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; Varioskan Flash 全波长扫描荧光酶标仪, 美国 Thermo 公司; Takara TP-600PCR 仪, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 全自动凝胶成像系统, Syngene 公司; PVDF 膜, 美国 Millipore 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MG-63 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 在 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱培养。待细胞完全融合时, 加入磷酸缓冲液 (PBS) 清洗 1~2 遍, 用 0.25% 胰酶消化, 细胞开始出现皱缩, 细胞间隙明显即可倒掉胰酶, 加入培养基吹打。以 1:3 传代比继续在 25 cm² 培养瓶中培养。3~4 d 传代 1 次, 传代 1~2 次后即可用于后续实验。

2.2 MTT 法测定细胞增殖

取对数生长期、生长状态良好的 MG-63 细胞, 以每孔 5 000 个接种于 96 孔板中。培养 24 h 后, 给药组加入 ESI (总黄酮质量浓度分别为 15.625、31.25、62.5、125、250、500 μ g/mL), 对照组加入等体积的培养基。药物作用 48 h 后弃去培养基, 加入 100 μ L MTT 溶液 (0.5 mg/mL) 37 °C 孵育 4 h。小心吸弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO 溶解紫色

结晶甲瓚，混匀。使用酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光度 (A) 值，以 630 nm 波长下 A 值作为参照。

2.3 LDH 活性测定

MG-63 细胞以每孔 5 000 个接种于 96 孔板，24 h 后给药组加入 ESI (总黄酮质量浓度分别为 31.25、62.5、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，对照组加入等体积的培养基。继续培养 48 h，取上清液，测定 LDH 释放量，检测步骤严格按照 LDH 试剂盒说明书操作。

2.4 ALP 活性测定

MG-63 细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 cm 培养板，待细胞融合度达到 80% 时加入 ESI (分组及给药情况同“2.3”项)。培养 48 h 后收集细胞，PBS 洗 2 遍，加入细胞裂解液涡旋破碎细胞，14 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min，取上清液，即为总蛋白，置于冰上，严格按照 ALP 试剂盒说明书操作测定 ALP 活性，检测波长为 520 nm。

2.5 I 型胶原蛋白水平测定

细胞处理及分组给药同“2.4”项。培养 3 d 后收集细胞。每个处理组加入 1 mL 6 mol/L HCl，110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 2.5 h 后，真空冷冻干燥。用蒸馏水重新溶解细胞水解产物，按照 Hyp 检测试剂盒说明书测定 Hyp 水平。以此来反映成骨细胞中 I 型胶原蛋白的水平。

2.6 ARS 染色鉴定骨矿化

MG-63 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板，待细胞融合度达到 80% 时，矿化组和给药组均加入含 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 抗坏血酸和 10 mmol/L β -甘油磷酸钠的 DMEM 培养基继续培养，给药操作同“2.3”项，对照组加入等体积的培养基。每 2 天换液，每天观察细胞状态。18 d 后倒置显微镜观察可看到细胞融合成片，并且有较多不透明的灶点，即为矿化结节。用 PBS 洗 2 遍，95% 乙醇固定细胞 10 min，蒸馏水浸洗。洗净后，加入 ARS-tris-HCl (40 mmol/L, pH 4.2)，37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30~60 min。加入蒸馏水清洗 2~3 遍，将未结合的染料洗掉后室温下干燥，倒置显微镜下观察照相。用 10% CPC 溶液溶解结合的 ARS，测定其在 550 nm 下 A 值，以定量钙沉积情况^[7-9]。

2.7 RT-PCR 检测骨保护素 (OPG) 和核因子- κ B 活化因子受体配体 (RANKL) mRNA 表达

将 MG-63 细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 cm 培养板，24 h 后加入相应浓度 ESI (分组及给药情况同“2.3”项)。48 h 后消化收集细胞。使用 Trizol 法提取总 RNA，使用 Reverse Transcriptase M-MLV

(RNase H) 将 RNA 逆转录合成 cDNA。PCR 扩增引物序列及反应条件：OPG 上游引物为 5'-GCTAACCTCACCTTCGAG-3'，下游引物为 5'-TGATTGGACCTGGTTACC-3'；RANKL 上游引物为 5'-GCCAGTGGGAGATGTTAG-3'，下游引物为 5'-TTAGCTGCAAGTTTTCCC-3'；GAPDH 上游引物为 5'-TACATTTTGCTGATGACTGG-3'，下游引物为 5'-TGAATGGTAGGAGCTTGACT-3'。PCR 扩增反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进入循环；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，循环 35 次；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，DNA 条带的单位面积灰度用凝胶成像仪测定，使用 Image J 软件分析电泳条带灰度，目的基因 mRNA 水平以与参照基因 GAPDH 的灰度比值表示。

2.8 Western blotting 检测 OPG 和 RANKL 蛋白表达

将 MG-63 细胞以每孔 8×10^5 个接种于 10 cm 培养板，融合达 80%，给药组加入 ESI (总黄酮质量浓度为 31.25、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，对照组加入等体积的培养基。48 h 后胰酶消化收集细胞，加入细胞裂解液提取总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，提取液中加入 5 \times SDS 上样缓冲液，煮沸变性 5 min，制备变性聚丙烯酰胺，浓缩胶 5%，分离胶 12%，上样，每孔含 80~100 μg 蛋白。转膜，将膜浸泡在 5% 脱脂牛奶中，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h；加一抗溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，第 2 天 37 $^{\circ}\text{C}$ 室温热孵 1 h，用 TBST 液洗 3 次，每次 10 min；加入对应的荧光二抗，室温孵育 40 min，用 TBST 液避光洗 3 次，每次 15 min，压片 10 min，显影 5 min，定影 5 min。Image J 软件分析图片中条带灰度值。实验重复 3 次。

2.9 SB203580 对 ESI 作用的影响

分别按照“2.2”“2.4”~“2.8”项方法接种培养细胞，培养 24 h 后弃培养基，对照组加入新鲜培养基，SB203580 组和 ESI+SB203580 组加入 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SB203580，作用 2 h 后，ESI 加药组和 ESI+SB203580 组均加入 ESI (总黄酮质量浓度 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 继续培养。分别按照“2.2”“2.4”~“2.8”项方法检测各项指标。

2.10 数据处理及统计分析

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件 One-way ANOVA 方差分析，组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 MG-63 细胞增殖和 LDH 活性

如图 1 所示，ESI 总黄酮质量浓度低于 125

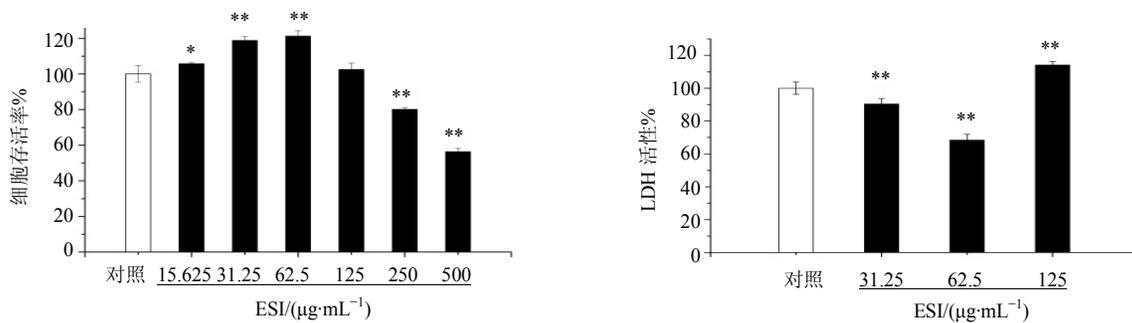
μg/mL 对 MG-63 细胞没有细胞毒性, 在 31.25、62.5 μg/mL 能够显著促进 MG-63 细胞增殖 ($P < 0.01$)。LDH 活性测定结果表明, 31.25、62.5 μg/mL 的 ESI 能够显著降低 MG-63 细胞 LDH 活性 ($P < 0.01$), 分别为对照组的 (90.40 ± 3.30)% 和 (68.42 ± 3.57)%, 保护了细胞膜的完整性。而 125 μg/mL 的 ESI 显著升高 LDH 活性, 表明高质量浓度 ESI 对 MG-63 细胞膜具有破坏作用 ($P < 0.01$)。

3.2 MG-63 细胞 ALP、I 型胶原蛋白水平和钙沉积变化

ALP 作为成骨细胞分化的标志酶, 其活性可以反映成骨细胞的活性和状态。31.25、62.5 μg/mL 的

ESI 作用于 MG-63 细胞 48 h 后, ALP 活性分别为对照组的 (141.05 ± 8.28)% 和 (164.02 ± 11.67)%, 均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

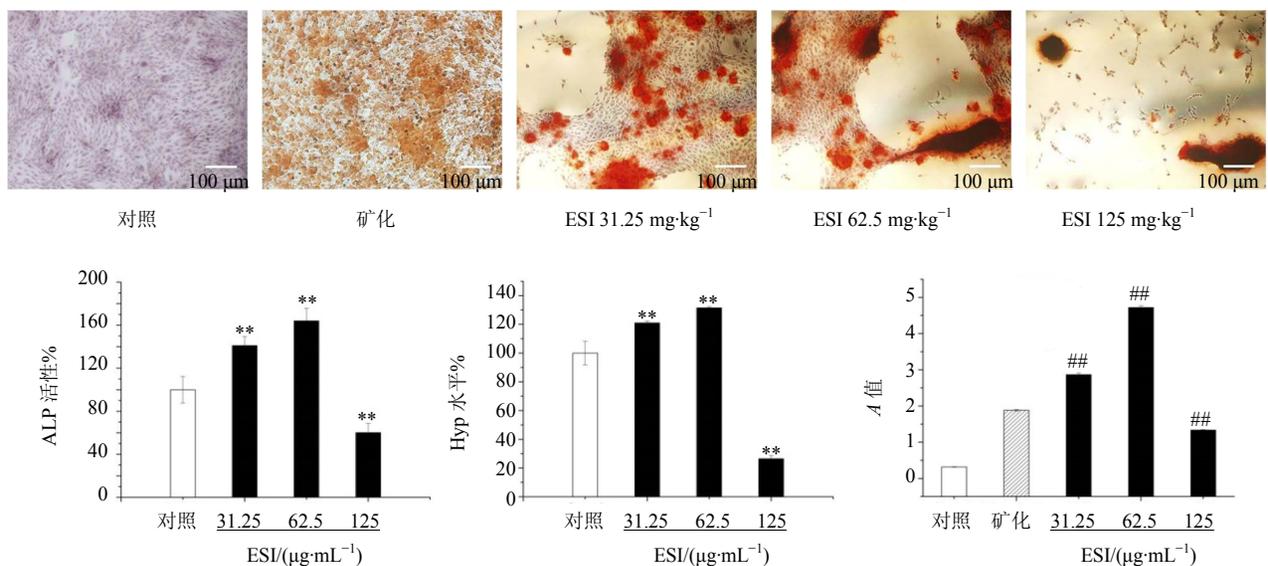
I 型胶原蛋白和钙的沉积均是影响骨基质矿化的重要因素。Hyp 在胶原蛋白中占 13.4%, 而在弹性蛋白中质量分数极少, 其他蛋白中均不存在。因此采用 Hyp 水平来反映胶原蛋白的水平。药物作用 MG-63 细胞 72 h 后, Hyp 分别为对照组的 (121.04 ± 1.20)% 和 (131.53 ± 0.77)%, 表明 ESI 处理 MG-63 细胞后, I 型胶原蛋白水平均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。结果见图 2。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 1 ESI 对 MG-63 细胞增殖和 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of ESI on proliferation and LDH activity of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与矿化组比较: ## $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs mineralization group

图 2 ESI 对 MG-63 细胞分化和矿化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of ESI on differentiation and mineralization of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

加入抗坏血酸和 β-甘油磷酸钠的矿化培养基培养细胞 18 d 后, 倒置相差显微镜观察, 矿化组与 ESI 组 (31.25、62.5、125 μg/mL) 均形成较多不透明的结节。ARS 染色后不透明结节呈红色圆形或不规则形状, 中心颜色较深。与矿化组比较, ESI 组形成的矿化结节更多, ARS 染色后红色更鲜亮, 表明 ESI 组增加了钙化区域。加入 10% CPC 洗脱 ARS 染色液后, 酶标仪检测 A 值结果显示, 31.25、62.5 μg/mL 的 ESI 处理组 A 值明显高于矿化组 ($P < 0.01$), 表明其形成更多的 ARS 和钙的复合物, 形成更多钙的沉积, 促进矿化基质的形成。结果见图 2。

如图 2 所示, 125 μg/mL 浓度的 ESI 处理 MG-63 细胞也形成矿化结节, 但由于 ESI 对 MG-63 细胞的毒性作用, 抑制了 ALP 活性、胶原蛋白形成和钙沉

积 ($P < 0.01$)。

3.3 MG-63 细胞 OPG 和 RANKL mRNA 的表达差异

RT-PCR 结果见图 3, 31.25、62.5、125 μg/mL ESI 上调 MG-63 细胞 OPG mRNA 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 并且均显著下调了 RANKL mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。表明 ESI 促进 MG-63 细胞分化和矿化的机制之一是调控 OPG 和 RANKL 基因表达。

3.4 MG-63 细胞 OPG 与 RANKL 蛋白比值变化

如图 4 所示, 与对照组相比, 31.25、62.5 μg/mL 的 ESI 能够显著提高 OPG 与 RANKL 的比值 ($P < 0.01$), 其中 62.5 μg/mL ESI 对 OPG/RANKL 值的影响较大, 进一步证明 ESI 对 MG-63 细胞分化的促进作用与 OPG 和 RANKL 基因的表达有关。

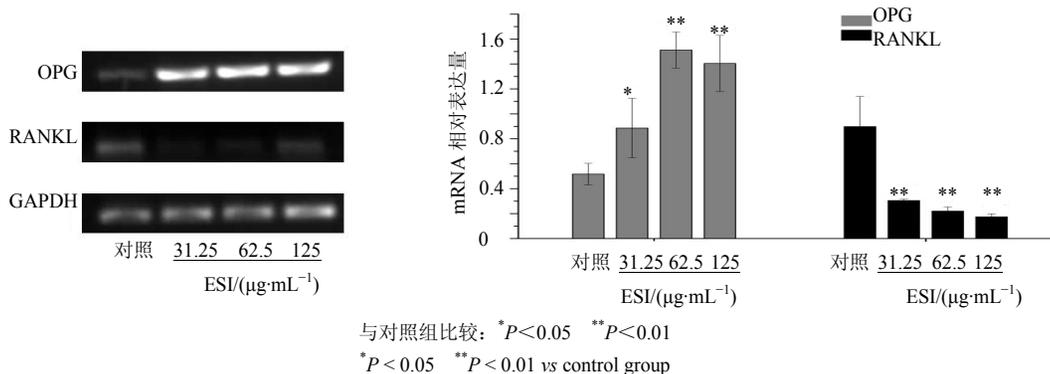


图 3 ESI 对 MG-63 细胞 OPG 和 RANKL mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of ESI on expression of OPG and RANKL mRNA in MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

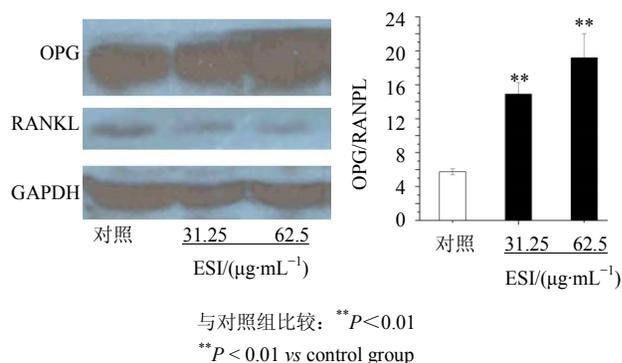


图 4 ESI 对 MG-63 细胞 OPG 和 RANKL 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of ESI on expression of OPG and RANKL protein in MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

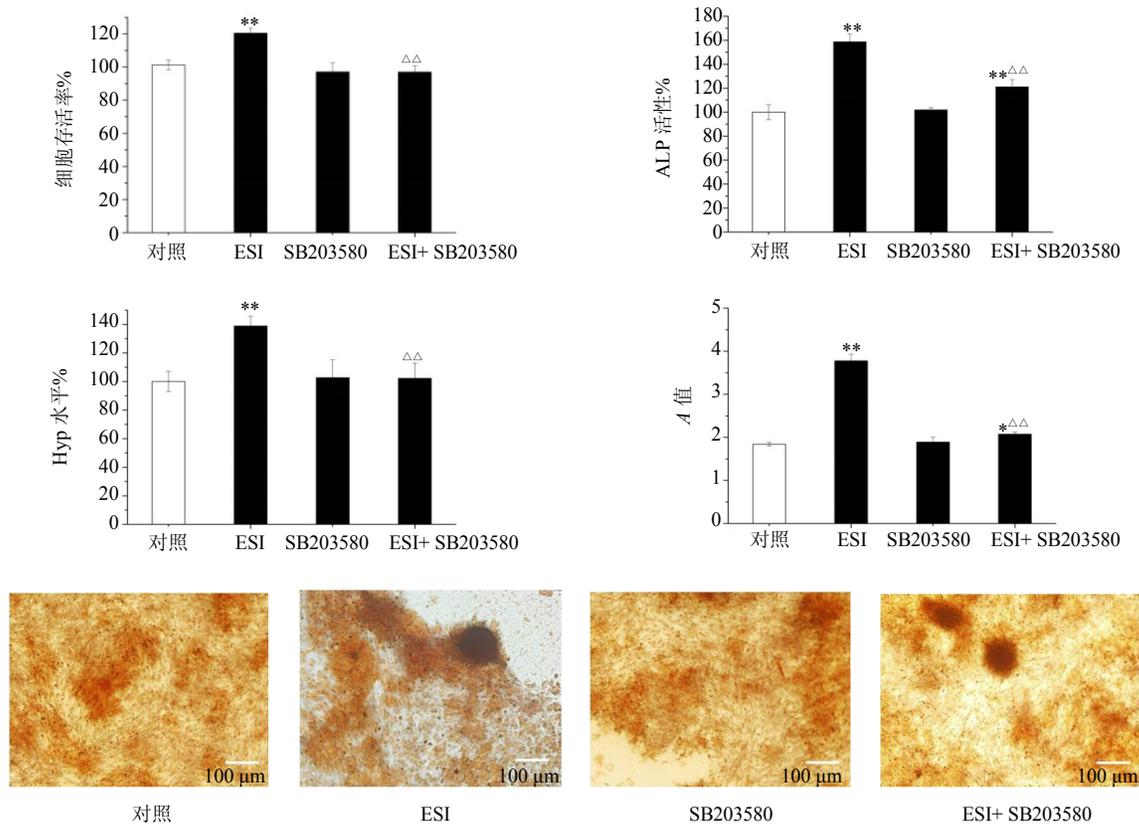
3.5 MG-63 细胞的 p38 MAPK 信号通路调控作用

经过 p38 特异性抑制剂 SB203580 干预处理, 如图 5 所示, MG-63 细胞增殖、分化和矿化均无明显变化, 与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。与

对照组相比, 加入 ESI (62.5 μg/mL) 明显增强了 MG-63 细胞增殖、ALP 活性、Hyp 水平以及矿化沉积程度 ($P < 0.01$); 与 ESI 组比较, ESI+SB203580 组明显抑制了 ESI 对 MG-63 细胞的增殖分化的诱导作用, 降低了 ALP 活性和 Hyp 水平, 并阻滞了矿化结节的形成 ($P < 0.01$)。

与 ESI 单独处理组相比较, 在 mRNA 水平上, SB203580 与 ESI 共同作用, 下调了 OPG mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 上调了 RANKL mRNA 的表达 ($P < 0.05$); 在蛋白水平上, 共同处理组抑制 OPG 蛋白的高表达, 促进了 RANKL 的表达, 从而显著降低了 OPG/RANKL 值 ($P < 0.01$), 结果见图 6。

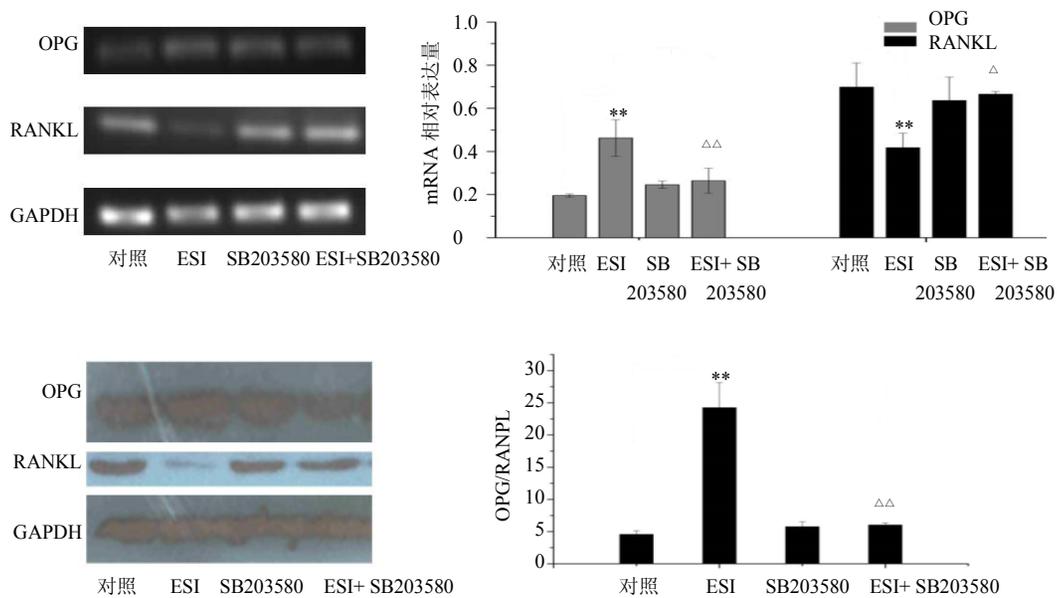
综上, 细胞增殖、ALP 活性、I 型胶原蛋白水平、矿化水平以及 OPG、RANKL 基因表达多个方面表明 p38 特异性抑制剂 SB203580 能够抑制 ESI 对成骨细胞 MG-63 分化的促进作用, 说明 ESI 对 MG-63 细胞的影响与 p38 MAPK 通路有关。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 ESI 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ESI group

图 5 ESI 和 SB203580 对 MG-63 细胞增殖、分化和矿化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of ESI and SB203580 on proliferation, differentiation, and mineralization of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 ESI 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ESI group

图 6 ESI 和 SB203580 对 MG-63 细胞 OPG 和 RANKL mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of ESI and SB203580 on mRNA and protein expression of OPG and RANKL in MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

世界卫生组织将骨健康系列问题疾病列为继心脑血管疾病、癌症、糖尿病“三大杀手”外对人体危害最广泛的问题。健康的骨骼通过持续的骨重塑来维持,而这一动态平衡由介导骨吸收的破骨细胞和介导骨形成的成骨细胞调节^[10-11]。但是由于绝经后雌激素缺乏、年龄增长或者疾病、药物等原因,导致骨形成和骨吸收之间的动态平衡被打破。除了适当的药物治疗之外,早期的骨骼强壮的维护和钙质的积累才是预防骨骼病变的更有效措施。

成骨细胞通过自身增殖、分化,诱导和调节细胞外基质矿化,并控制骨重建过程。在骨形成过程中,成骨细胞经历了成骨细胞增殖、细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和成骨细胞凋亡 4 个阶段。MTT 和 LDH 活性检测结果表明 ESI 在低于 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对体外成骨样细胞没有毒性,且在 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 62.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时具有显著促进细胞增殖的保护作用。成骨细胞增殖晚期,开始出现分化,ALP 是成骨细胞分化的早期指标^[12],ALP 能够水解有机磷酸酯,使局部 PO_4^{3-} 浓度升高,启动钙化^[10]。实验发现 ESI 可显著提高成骨细胞 ALP 活性。

在骨形成阶段,成熟的成骨细胞合成和分泌 I 型胶原蛋白和各种非胶原蛋白,如骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN)和骨唾液酸蛋白(BSP)。实验结果表明,ESI 能够提高 MG-63 细胞的 Hyp 水平,即提高 I 型胶原蛋白的水平,胶原蛋白水平的提高,能够使骨骼具有韧性和弹性,吸收外界能量;同时它所形成的空间三维网状结构是矿化的前提^[13];ARS 染色实验结果也证明,ESI 能够促进矿化结节的形成,即促进钙的积累;这一结果表明 ESI 可增加骨强度,帮助提高骨峰值,降低发生骨折的可能性。

此外,成骨细胞还分泌 OPG、RANKL 等细胞因子,将破骨细胞的骨吸收偶联起来,调节破骨细胞的分化和活性,在骨吸收过程中也起关键性作用^[14-17]。ESI 通过上调 OPG 的表达,降低 RANKL 的表达来影响 MG-63 细胞的分化和矿化。

成骨细胞的生长和分化由受体酪氨酸激酶介导,许多细胞外信号调节该激酶,其中大多数是激活 Ras 丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)级联反应^[18]。p38 MAPK 是 MAPK 信号转导途径的通道之一,p38 MAPK 是由各种环境刺激和因子引起的细胞反应所激活,它能调节成骨细胞中 OPG 和/或 RANKL 的表达^[19]。本实验用特异性阻断剂 SB203580 阻断

p38MAPK 信号转导通路,发现对 ESI 介导的成骨样细胞的增殖分化的促进作用以及对 OPG/RANKL 表达的上调作用均有明显抑制,表明 ESI 促进成骨样细胞增殖、分化,促进骨形成可通过 p38 MAPK 通路介导。由于阻断 p38 MAPK 通路并不能完全抑制 ESI 促进成骨样细胞的分化作用,因此,ESI 可能依赖 ERK、c-Jun N 端激酶 JNK 等通路影响成骨细胞,将有待于进一步研究。

综上所述,ESI 在细胞水平上能够促进人成骨样细胞 MG-63 增殖分化以及骨基质的形成,表现出抗骨质疏松作用,但是在细胞水平上,还可通过成骨细胞和破骨细胞共培养模型,或三维培养模型进一步评价。将 ESI 作用于去势大鼠,发现其能够增加去势大鼠骨钙浓度,显著增加骨密度^[20],但是,抗骨质疏松的功效评价仍需要整体水平的动物模型实验,包括原发性、继发性及基因重组骨质疏松动物模型等,进一步探究其抗骨质疏松的临床意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李 燕. 天山雪莲全草及其细胞培养物化学成分的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- [3] Lo Y C, Chang Y H, Wei B L, *et al.* Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells: involvement of BMP/Runx2 and β -catenin signals [J]. *Agric Food Chem*, 2010, 58(11): 6643-6649.
- [4] Jiang S D, Yang Y H, Chen J W, *et al.* Isolated osteoblasts from spinal cord-injured rats respond less to mechanical loading as compared with those from hindlimb-immobilized rats [J]. *Spinal Cord Med*, 2013, 36(3): 220-224.
- [5] Niu Y B, Li Y H, Kong X H, *et al.* The beneficial effect of Radix dipsaci total saponins on bone metabolism *in vitro* and *in vivo* and the possible mechanisms of action [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(11): 2649-2660.
- [6] Lewiecki E M. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(11): 631-638.
- [7] 樊 秦, 赵文君, 李应东. 华中五味子含药血清对成骨细胞增殖分化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2): 33-35.
- [8] Miyamoto S, Miyamoto Y, Shibata Y, *et al.* In situ quasi-static and dynamic nanoindentation tests on calcified nodules formed by osteoblasts: Implication of glucocorticoids responsible for osteoblast calcification [J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 12(15): 216-226.

- [9] Cho Y E, Alcantara E H, Kuinanan S, *et al.* Red yeast rice stimulates osteoblast proliferation and increases alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells [J]. *Nutr Res*, 2010, 30(7): 501-510.
- [10] Harada S, Rodan G A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 349-355.
- [11] Li B, Ling Chau J F, Wang X, *et al.* Bisphosphonates, specific inhibitors of osteoclast function and a class of drugs for osteoporosis therapy [J]. *Cell Biochem*, 2011, 112(5): 1229-1242.
- [12] Lee H S, Jung E Y, Bae S H, *et al.* Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by yeast hydrolysate [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(5): 716-723.
- [13] Saito M, Marumo K, Kida Y, *et al.* Changes in the contents of enzymatic immature, mature, and non-enzymatic senescent cross-links of collagen after once-weekly treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months contribute to improvement of bone strength in ovariectomized monkeys [J]. *Osteoporos Int*, 2011, 22(8): 2373-2383.
- [14] Li F, Yang Y, Zhu P, *et al.* Echinacoside promotes bone regeneration by increasing OPG/RANKL ratio in MC3T3-E1 cells [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1443-1450.
- [15] 仲蕾蕾, 杨冰, 黄晓斌, 等. OPG/RANKL/RANK系统在成骨细胞和破骨细胞相互调节中的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(11): 1010-1013.
- [16] Kearns A E, Khosla S, Kostenuik P J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(2): 155-192.
- [17] Silvestrini G, Ballanti P, Sebastiani M, *et al.* OPG and RANKL mRNA and protein expressions in the primary and secondary metaphyseal trabecular bone of PTH-treated rats are independent of that of SOST [J]. *J Mol Hist*, 2008, 39(2): 237-242.
- [18] 王慧, 李玉坤. 成骨细胞分化调控因子研究进展 [J]. 国际骨科学杂志, 2011, 32(6): 377-379.
- [19] Luo X H, Guo L J, Xie H, *et al.* Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway [J]. *J Bone Min Res*, 2006, 21(10): 1648-1656.
- [20] 王怡薇, 刘雅萍, 张献, 等. 雪莲细胞培养物对卵巢切除大鼠骨密度的影响 [J]. 国际中医中药杂志, 2014, 36(9): 824-826.