

莫诺苷对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞炎症的保护作用及机制研究

杨炳友, 刘 艳, 林晓影, 韩 伟, 姜海冰, 韩 华, 吕邵娃, 匡海学*

黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 目的 研究莫诺苷对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导成骨细胞 MC3T3-E1 炎症的保护作用, 探讨 Caspase、MAPK 和 NF- κ B 通路调控机制。方法 TNF- α (50 ng/mL) 诱导 MC3T3-E1 细胞, 制备细胞炎症模型; MTT 法检测莫诺苷对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响, 并检测不同浓度的莫诺苷对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞活力的影响; ELISA 法检测细胞上清液中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 的水平; Western blotting 法检测 Caspase-3、Caspase-9、p-ERK、p-JNK、p-p38、p-I κ B α 、I κ B α 和 NF- κ B 等相关蛋白的表达。结果 莫诺苷能够促进正常 MC3T3-E1 细胞增殖, TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞增殖受到抑制, 而莫诺苷对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞具有保护作用; 莫诺苷可以抑制 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞 IL-1 β 和 IL-6 的释放; 降低 Caspase-3、Caspase-9、p-ERK、p-JNK、p-p38、p-I κ B α 蛋白的表达, 升高 I κ B α 蛋白表达, 对 NF- κ B p65 无明显影响。结论 莫诺苷对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 炎症细胞有保护作用, 其机制为抑制炎症因子的释放、抑制 MAPK 和 NF- κ B 通路的激活、抑制凋亡蛋白 Caspase 的表达, 从而抑制 MC3T3-E1 细胞的凋亡。

关键词: 接骨木; 莫诺苷; 肿瘤坏死因子- α ; MC3T3-E1; 炎症; Caspase

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3776-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.008

Protective effect and mechanism of morroniside on TNF- α -induced MC3T3-E1 cells via inhibiting inflammation

YANG Bing-you, LIU Yan, LIN Xiao-ying, HAN Wei, JIANG Hai-bing, HAN Hua, LV Shao-wa, KUANG Hai-xue

Key Laboratory of Chinese Materia Medica (Ministry of Education), Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the effects of morroniside extracted from root-bark of *Sambucus williamsii* on TNF- α -induced MC3T3-E1 cell inflammation, and explore its mechanism of action including Caspase, MAPK, and NF- κ B signaling pathway. **Methods** MC3T3-E1 cells were cultured in medium containing TNF- α (50 ng/mL) and different doses of morroniside. The cell viability was examined by MTT assay, and the levels of IL-1 β and IL-6 in the supernatants were identified by ELISA. The expressions of Caspase-3, Caspase-9, p-ERK, p-JNK, p-p38, p-I κ B α , I κ B α , and NF- κ B on the protein level was tested by Western blotting. **Results** MTT assay results showed that morroniside could promote the proliferation of MC3T3-E1 cells and protect the MC3T3-E1 cells induced by TNF- α . ELISA results showed that the expressions of IL-1 β and IL-6 were inhibited. Meanwhile, morroniside could reduce the expression of Caspase3, Caspase9, p-ERK, p-JNK, p-p38, and p-I κ B α protein, and increase I κ B α protein expression while there was no significant difference in the expression of NF- κ B p65. **Conclusion** Morroniside has protective effect on TNF- α -induced MC3T3-E1 cells inflammation. The possible related mechanism is that morroniside inhibits the release of inflammatory cytokines, the activation of MAPK and NF- κ B pathway, and the expression of Caspase, thereby inhibiting the apoptosis of MC3T3-E1 cells.

Key words: *Sambucus williamsii* Hance; morroniside; TNF- α ; MC3T3-E1; inflammation; Caspase

接骨木 *Sambucus williamsii* Hance 为忍冬科接骨木属植物, 具有接骨续筋、活血止痛、祛风利湿等

功效^[1-3]。前期实验表明, 接骨木根皮中促进骨折愈合的有效部位为 50%乙醇洗脱部分, 其中拆分环烯

收稿日期: 2017-11-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173501); 哈尔滨市应用技术与开发项目计划 (2014AB3AS045)

作者简介: 杨炳友 (1970—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药及复方药效物质基础。Tel: (0451)87267038 E-mail: ybywater@163.com

*通信作者 匡海学 (1955—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药及复方药效物质基础。Tel: (0451)87267188 E-mail: hxkuang56@163.com

醚萜组分是有效活性成分之一,而莫诺昔是接骨木根皮有效部位中含量最大的环烯醚萜类化合物(质量分数>50%),为最主要的活性成分^[4-10]。为了进一步深入研究莫诺昔对骨折伴随着炎症反应的影响,本实验采用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导MC3T3-E1成骨细胞炎症模型^[11-12],研究莫诺昔对炎症细胞的保护作用,通过莫诺昔对炎性因子的影响以及细胞凋亡蛋白酶(Caspase)、丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)、核转录因子 κ B (NF- κ B)通路相关蛋白表达变化,探讨莫诺昔保护成骨细胞的作用机制,为揭示接骨木治疗骨折愈合的机制研究提供实验数据和科学依据。

1 材料

1.1 仪器

HERACELL 150i CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); VICTOR X3 全自动酶标仪(美国 PerkinElmer 公司); Vet.A1 荧光倒置显微镜(德国 ZEISS 公司); WT-1ND 洁净工作台(北京王堂蓝翼科技有限公司); PowerPacBasic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); TDL-4 低速离心机(上海安亭科技仪器厂); GI54DS 高压灭菌锅(厦门致微仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂

莫诺昔单体化合物从接骨木 *Sambucus williamsii* Hance 根皮中分离得到,收率 0.06%,质量分数>96%,由黑龙江中医药大学中药化学教研室提供;胰酶细胞消化液、青霉素-链霉素溶液、 α -MEM 培养基(美国 Hyclone 公司); MTT、DMSO(美国 Sigma 公司); TNF- α 细胞因子(美国 PeproTech 公司); 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 ELISA 试剂盒(上海拜力生物科技有限公司); Caspase-3 (H-277) 抗体、Caspase-9 (H170) 抗体、p-ERK (Tyr204) 抗体、p-JNK (G-7) 抗体、p-p38 (Tyr-182) 抗体、p-I κ B- α (B-9) 抗体、I κ B- α (C-21) 抗体、NF- κ B-p65 (S-109) 抗体、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司); 其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞株

MC3T3-E1 细胞购自中国典型培养物保藏中心。完全培养基为含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素溶液的 α -MEM 培养基,于 5% CO₂、37 °C 恒温细胞培养箱中培养,待细胞长满胰酶消化,进行传代。

2 方法

2.1 莫诺昔对 MC3T3-E1 细胞生长的影响

将对数生长期的 MC3T3-E1 细胞以密度为 3×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L。24 h 细胞完全贴壁后,吸去培养基,除对照组外,其余组加入用 α -MEM 完全培养基配制的不同浓度的莫诺昔,终浓度分别为 7.5、15、30、60、90、180 μ mol/L,每孔 200 μ L。37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后,每孔加入质量浓度为 5 mg/L MTT 10 μ L,继续于 37 °C 培养 4 h,弃去培养液,每孔加 150 μ L DMSO,震荡 10 min,待结晶完全溶解后,酶标仪 570 nm 测定吸光度(A)值,计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞的活力的影响

MC3T3-E1 细胞以密度为 3×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L。贴壁 24 h 后,吸去培养基,对照组和 TNF- α 组加入完全培养基,其余组加入莫诺昔 90、180 μ mol/L,每孔 200 μ L,作用 1 h 后,除对照组外,其他各组均加入 TNF- α ,使其终质量浓度为 50 ng/mL,作用 MC3T3-E1 细胞 48 h,每孔加入 5 mg/L MTT 10 μ L,继续于 37 °C 培养 4 h,弃去培养液,每孔加 150 μ L DMSO,震荡 10 min,待结晶完全溶解后,酶标仪 570 nm 下检测各组细胞的 A 值。

2.3 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平的影响

将 MC3T3-E1 细胞以密度为 1×10^6 个/mL 加入 6 孔板内,每孔 1 mL,根据 MTT 检测结果,实验分为 4 组,分别为对照组、TNF- α 组、莫诺昔(90 μ mol/L)+TNF- α 组、莫诺昔(180 μ mol/L)+TNF- α 组,加药处理同“2.2”项,TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞 48 h 后,取上清液,采用 ELISA 法检测 IL-1 β 和 IL-6,按试剂盒说明书操作。

2.4 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞 Caspase、MAPK 和 NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

采用 Western blotting 法,细胞分组、接种及给药方法同“2.3”项,TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞 48 h 后,用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,然后加入 Ripa 裂解液,刮取细胞置冰上 30 min 完全裂解,4 °C、13 500 r/min 离心 20 min,取上清即为总蛋白,BCA 测定蛋白浓度,剩余蛋白加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液,100 °C 变性 5 min,-80 °C 保存。总蛋白每孔上样含

35 μg 蛋白, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, NC 膜湿转 2 h, 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。一抗 (Caspase-3、Caspase-9、p-ERK、p-JNK、p-p38、p-I κ B α 、I κ B α 、NF- κ B p65) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次, 二抗山羊抗兔 (鼠) HRP 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次, ECL 发光显色。实验平行 3 次。

2.5 统计学分析

所得实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 其中组间比较采用 ANOVA 检验分析后, 进行 Duncan's *t*-test 评估。

3 结果

3.1 莫诺昔对正常 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示, 莫诺昔对 MC3T3-E1 细胞增殖有明显促进作用, 呈浓度依赖性, 见图 1。与对照组比较, 莫诺昔浓度为 90、180 $\mu\text{mol/L}$ 时具有显著地促进细胞增殖作用 ($P < 0.01$), 因此选择 90、180 $\mu\text{mol/L}$ 莫诺昔进行后续实验。

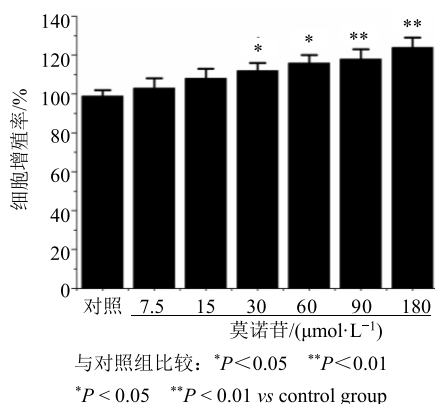


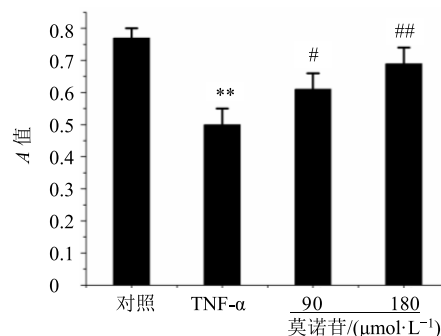
图 1 莫诺昔对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effects of morroniside on proliferation of MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 与对照组比较, TNF- α 组 MC3T3-E1 细胞增殖被显著抑制 ($P < 0.01$); 与 TNF- α 组比较, 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞增殖具有显著促进作用 ($P < 0.05$ 、0.01), 见图 2。

3.3 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞炎症因子分泌的影响

ELISA 检测实验结果显示, 与对照组比较, TNF- α 作用 MC3T3-E1 细胞 48 h 时, 细胞炎症因子分泌显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。与 TNF- α 组比较, 莫诺昔组 MC3T3-E1 细胞炎症因子 IL-6 分泌显著减



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 2 莫诺昔对 TNF- α 诱导的 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of morroniside on proliferation of MC3T3-E1 cells stimulated by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

少 ($P < 0.05$); IL-1 β 水平也显著降低 ($P < 0.01$), 见表 1。

3.4 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞 Caspase、MAPK 和 NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

Western blotting 实验结果显示, 与对照组比较, TNF- α 组细胞凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达增加, MAPK 通路蛋白 p-p38、pJNK 和 pERK 表达增加, NF- κ B 通路被激活 (I κ B- α 蛋白表达下降、p-I κ B- α 蛋白表达增加)。与 TNF- α 组比较, 莫诺昔 (90、180 $\mu\text{mol/L}$) 作用 MC3T3-E1 细胞 48 h 后, 能够抑制 TNF- α 引起的凋亡蛋白 (Caspase-3、Caspase-9) 表达量的增加, 且呈浓度依赖性; 能够抑制 TNF- α 引起的 MAPK 通路蛋白表达的增加, 且呈浓度依赖性; 能够抑制 TNF- α 引起的 NF- κ B 的激活 (p-I κ B- α 蛋白表达上调、I κ B- α 蛋白下调)。结果表明, 莫诺昔可通过抑制 MAPK 和 NF- κ B 通路的激活、抑制凋亡蛋白 Caspase 的表达而抑制 MC3T3-E1 细胞的凋亡, 见图 3。

表 1 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞 IL-1 β 和 IL-6 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of morroniside on secretion of IL-1 β and IL-6 in MC3T3-E1 cells induced by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β /(ng·mL $^{-1}$)	IL-6/(ng·mL $^{-1}$)
对照	—	0.010 $\pm$ 0.003	260.45 $\pm$ 23.43
模型	—	2.780 $\pm$ 0.050**	340.53 $\pm$ 45.28*
莫诺昔	90	0.090 $\pm$ 0.003##	318.56 $\pm$ 35.09
	180	0.040 $\pm$ 0.001##	265.65 $\pm$ 22.72#

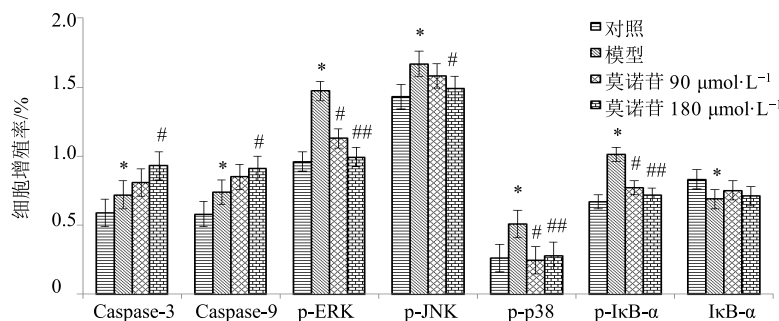


图 3 莫诺昔对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 细胞 Caspase、NF- κ B 和 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of morroniside on related protein expressions of Caspase, NF- κ B, and MAPK pathway in MC3T3-E1 cells induced by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

细胞在产生炎症和凋亡作用时,可由多条通路相互作用调控。如 MAPK 信号通路,是典型的参与调控组织或细胞炎症和凋亡作用的分子通路,主要包括 JNK、p38 和 ERK 蛋白通路。当 JNK 蛋白被磷酸化后,可作用于胞内线粒体,进而启动执行细胞凋亡分子如 Caspase-3, Caspase-3 介导的促凋亡作用,使胞内 DNA 裂解而引起细胞凋亡。另外,当 ERK 和 p38 蛋白磷酸化后,可介导多种炎症介质的表达而引起炎症反应,如 IL-6、IL-1 β 的分泌,而促进细胞凋亡^[13-14]。本研究结果显示莫诺昔对 TNF- α 诱导的成骨细胞中 IL-6、IL-1 β 炎症因子具有抑制作用,产生抗炎效果;并且对 MAPK 信号通路 3 种磷酸化蛋白产生抑制作用,同样表现出抗炎效果;下调促凋亡蛋白 Caspase-3 蛋白表达,对细胞产生保护作用。

NF- κ B 是具有多向转录调节作用的转录因子,能参与调控多种疾病中的炎症和凋亡反应。主要由 p50 和 p65 亚单位组成,p65 亚单位是主要的促炎单位,可参与众多炎症反应相关基因的转录调控。当外界诱导时,可使 I κ B α 磷酸化并触发 I κ B α 磷酸化而使其泛素化和降解,释放 p65/p50 的络合物,易位至细胞核与调节区的启动子结合,启动炎症和凋亡靶基因的转录,进而引起炎症和凋亡反应^[15]。本研究结果显示莫诺昔对 TNF- α 诱导的成骨细胞中磷酸化 I κ B α 蛋白表达上调具有抑制作用,从而抑制促炎细胞因子表达而发挥作用。

作为一种环烯醚萜类成分,相较于其他常见的环烯醚萜类成分,如京尼平、獐牙菜苦苷、马钱苷等,在发挥抗炎作用时具有不同的作用机制。京尼平类成分主要是通过抑制环氧合酶-2 (COX-2) 介

导的前列腺素 E₂ (PGE₂) 和一氧化氮合酶 (NOS) 介导的 NO 产生,且能够激活内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的活化从而发挥抗炎作用^[16]。獐牙菜苦苷主要是通过减少 PGE₂、COX-2、iNOS、MMPs 等水平,同时抑制 p-JAK2、p-STAT3 等蛋白的表达而起到抗炎活性^[17]。而马钱苷能够显著提高炎症因子 IL-10 的含量,降低致炎因子 IL-23 的含量^[18]。本研究发现莫诺昔可通过抑制 MAPK 和 NF- κ B 通路激活、抑制凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达,进而抑制 TNF- α 引起 MC3T3-E1 细胞凋亡反应。这些通路之间的调控关系尚未可知,不排除莫诺昔可能单独对 Caspase、MAPK 和 NF- κ B 通路产生抑制作用,进而抑制炎症和凋亡反应的发生,还可能过抑制 JNK 蛋白的活化,并直接作用于 Caspase-3 蛋白而抗凋亡,或者抑制 p38 蛋白的活化,进一步抑制 NF- κ B 通路的激活而引起抗炎及抗凋亡作用,其确切机制有待深入研究。

参考文献

- [1] 余传隆,黄泰康,丁志遵,等. 中药辞海 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [2] 韩 华,闫雪莹,匡海学,等. 接骨木的研究进展 [J]. 中医药信息, 2008, 25(6): 14-16.
- [3] 曲 娜,张继伟,周 杨,等. 接骨木中莫诺昔的研究进展 [J]. 牡丹江医学院学报, 2016, 37(1): 106-107.
- [4] Yang B, Lin X, Yang C, et al. *Sambucus williamsii* Hance promotes MC3T3-E1 cells proliferation and differentiation via BMP-2/Smad/p38/JNK/Runx2 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(11): 1692-1699.
- [5] Yang B, Lin X, Tan J, et al. Root bark of *Sambucus williamsii* Hance promotes rat femoral fracture healing by the BMP-2/Runx2 signaling pathway [J]. *J*

- Ethnopharmacol*, 2016, 191: 107-114.
- [6] 韩 华. 接骨木根皮促进骨折愈合有效部位化学成分和药理作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2006.
- [7] 林晓影, 杨炳友, 何娅雯, 等. 接骨木根皮促进骨折愈合有效部位拆分及抗炎作用的研究 [J]. 中医药信息, 2016, 33(3): 29-32.
- [8] 林晓影, 杨炳友, 何娅雯, 等. 接骨木根皮促进骨折愈合有效部位和有效组分对骨折大鼠血液流变学的影响 [J]. 中医药信息, 2017, 34(1): 55-57.
- [9] 杨炳友, 宋丹丹, 韩 华, 等. 接骨木根皮的化学成分研究(I) [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1367-1372.
- [10] 刘俊超, 刘 丹, 贾银芝, 等. 莫诺苷对晚期糖基化终末产物诱导人脐静脉内皮细胞损伤的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2674-2681.
- [11] 赵奇江, 李芬芬, 董新威, 等. 他汀类药物对 TNF 诱导成骨细胞生长抑制的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(5): 389-393.
- [12] 蔡淑娜, 萧智利. 脂多糖诱导成骨细胞 MC3T3-E1 中 MMP-13 表达的分子机制研究 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2014, 34(11): 1599-1604.
- [13] 夏洪平, 杨惠玲. p38MAPK 信号传导通路及其与细胞凋亡 [J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 2005, 26(2): 1-6.
- [14] 魏 娜, 贺海波, 张长城, 等. JNK 信号通路和细胞凋亡关系的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(7): 807-812.
- [15] 苏剑东, 吴灵飞. NF- κ B 与细胞凋亡 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(12): 1411-1416.
- [16] 杨轶舜, 张 彤, 于筛成. 京尼平的研究进展及其药理价值 [J]. 中成药, 2011, 33(1): 130-133.
- [17] 陈 康, 吴 涛, 宋红萍. 獐牙菜苦苷的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(10): 1684-1688.
- [18] 秦静海. 中药马钱子对佐剂性关节炎大鼠血清中炎症因子的干预作用 [J]. 中国实用医药, 2012, 7(19): 52-53.