

## • 药理与临床 •

## 熟地黄的大麻素 2 型受体激动剂活性及对骨代谢的调控作用研究

胡思婧<sup>1</sup>, 练晨霞<sup>1</sup>, 张奇<sup>1</sup>, 周灏<sup>1</sup>, 史晓林<sup>2</sup>, 程刚<sup>1</sup>, 张泉龙<sup>1</sup>, 赵琦明<sup>1</sup>, 张巧艳<sup>1</sup>, 赵瑛<sup>3\*</sup>, 秦路平<sup>1\*</sup>

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江省新华医院, 浙江 杭州 310000

3. 咸阳市中心医院, 陕西 咸阳 712000

**摘要:**目的 探究熟地黄的大麻素 2 型受体 (cannabinoid receptor 2, CB2R) 激动活性及其对骨代谢的调控作用。方法 采用双荧光素酶报告基因建立 CB2R 调节剂筛选体系; 分别给予熟地黄提取物或 CB2R 选择性激动剂 HU308 或 CB2R 反向激动剂 AM630 处理, 采用 CCK-8 法测定成骨细胞和破骨细胞的增殖活性; 采用磷酸苯二钠法测定成骨细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 的活性; 采用流式细胞仪测定成骨细胞的细胞周期; 采用 ALP 染色观察成骨细胞分化; 采用茜素红染色观察成骨细胞骨矿化结节的形成; 采用 TRAP 染色观察破骨细胞数目; 采用罗丹明-鬼笔环肽染色镜观察破骨细胞 F-肌动蛋白 (F-actin) 环的结构和形态; 采用 Western blotting 检测 CB2R 及骨代谢相关蛋白的表达。结果 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  熟地黄显著升高 HEK293-CB2R 细胞 CB2R 表达 ( $P < 0.001$ ), 抑制 forskolin 刺激的 HEK293-CB2R 细胞中环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的产生, 并且其对 CB2R 的激动活性可被 AM630 逆转 ( $P < 0.001$ )。500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  熟地黄显著促进成骨细胞增殖 ( $P < 0.001$ ), 升高 ALP 活性 ( $P < 0.001$ ), 促进骨矿化结节形成, 上调 CB2R 及骨形成相关蛋白的表达 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 抑制 p38 的表达 ( $P < 0.05$ ); 抑制破骨细胞形成分化, 降低 TRAP 活性 ( $P < 0.001$ ), 抑制 F-actin 环的形成, 下调 CB2R、p-p38 和骨吸收相关蛋白的表达 ( $P < 0.05$ 、0.001); 熟地黄对成骨细胞和破骨细胞的作用可被 AM630 逆转 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 熟地黄具有特异性的 CB2R 激动活性, 并可通过 CB2R 调控成骨细胞和破骨细胞的功能。

**关键词:** 熟地黄; 大麻素 2 型受体激动剂; 双荧光素酶报告基因; 成骨细胞; 破骨细胞; 地黄苷 D

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2022)20 - 6481 - 11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.020

## Agonistic activity of *Rehmanniae Radix Praeparata* on cannabinoid receptor 2 and its regulatory effects on bone metabolism

HU Si-jing<sup>1</sup>, LIAN Chen-xia<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>, ZHOU Hao<sup>1</sup>, SHI Xiao-lin<sup>2</sup>, CHENG Gang<sup>1</sup>, ZHANG Quan-long<sup>1</sup>, ZHAO Qi-ming<sup>1</sup>, ZHANG Qiao-yan<sup>1</sup>, ZHAO Ying<sup>3</sup>, QIN Lu-ping<sup>1</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang Xinhua Hospital, Hangzhou 310000, China

3. Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, China

**Abstract: Objective** To investigate the agonistic activity of Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*, RRP) on cannabinoid receptor 2 (CB2R) and its regulatory effects on bone metabolism. **Methods** The CB2R regulator screening system was established by using double luciferase reporter gene. After treatment with RRP extract or CB2R selective agonist HU308 or CB2R inverse agonist AM630, the proliferation of osteoblasts and osteoclasts was detected by CCK-8. The activities of alkaline phosphatase (ALP) in

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973534)

作者简介: 胡思婧, 女, 博士研究生, 研究方向为中药活性成分及其作用研究。E-mail: hsj960321@163.com

\*通信作者: 赵瑛, 主管护师, 主要从事临床护理工作。E-mail: zhao13892919525@163.com

秦路平, 博士, 教授, 主要从事中药资源及品质评价研究。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

osteoblasts and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) in osteoclasts were determined by disodium phenylphosphate method. The cell cycle of osteoblasts was determined by flow cytometry. The osteoblastic differentiation was observed by ALP staining. Alizarin red staining was used to observe the formation of bone mineralized nodules in osteoblasts. The number of osteoclasts was observed by TRAP staining. The structure and morphology of F-actin ring in osteoclasts were stained with rhodamine-phalloidin and observed with laser confocal microscopy. The expressions of CB2R and related proteins with bone metabolism were detected by Western blotting. **Results** 500  $\mu\text{g/mL}$  RRP significantly increased CB2R expression in HEK293-CB2R cells ( $P < 0.001$ ), inhibited the production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in HEK293-CB2R cells stimulated by forskolin, and its agonistic activity on CB2R could be reversed by AM630 ( $P < 0.001$ ). 500  $\mu\text{g/mL}$  RRP significantly promoted the proliferation of osteoblasts ( $P < 0.001$ ), increased the activity of ALP ( $P < 0.001$ ), promoted the formation of bone mineralized nodules, and up-regulated the expressions of CB2R and bone formation-related proteins ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), inhibited the expression of p38 ( $P < 0.05$ ); 500  $\mu\text{g/mL}$  RRP inhibited the formation and differentiation of osteoclasts, decreased TRAP activity ( $P < 0.001$ ), inhibited the formation of F-actin ring, down-regulated CB2R, p-p38 and bone resorption-related proteins expressions ( $P < 0.05, 0.001$ ); The effect of RRP on osteoblasts and osteoclasts could be reversed by AM630 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** RRP has specific CB2R agonistic activity, and can regulate the functions of osteoblasts and osteoclasts through CB2R.

**Key words:** *Rehmanniae Radix Praeparata*; cannabinoid receptor 2 agonist; double luciferase reporter gene; osteoblast; osteoclast; rehmansioid D

大麻素 2 型受体(cannabinoid receptor 2, CB2R)为 G 蛋白偶联受体超家族成员,参与炎症、纤维化、疼痛及骨代谢等多种生物活性的调节<sup>[1]</sup>。研究发现, CB2R 激动剂如 HU308 及其对映体 HU433 参与成骨细胞和破骨细胞功能的调节,可减缓去卵巢诱导的大鼠骨丢失<sup>[2]</sup>; CB2R 激动剂 4-喹诺酮-3-羧酰胺(4-quinolone-3-carboxamides, 4Q3C)可减缓胶原诱导关节炎(collagen induced arthritis, CIA)小鼠炎性细胞浸润、破骨细胞数量及骨骼组织破坏, CB2R 反向激动剂 AM630 可以逆转 4Q3C 对 CIA 小鼠骨骼的保护作用。因此, CB2R 激动剂具有潜在的调节骨代谢的作用,可用于骨丢失相关疾病的治疗<sup>[3-5]</sup>。大麻中含有多种结构类型的 CB2R 激动剂,同时也对 CB1R 有激动作用,可导致精神样不良反应<sup>[6]</sup>。因此,从大麻以外的药用植物及中药中发现无精神样不良反应的 CB2R 调节剂,并研究其对骨代谢的调控作用,对于阐明植物药及中药抗骨质疏松的作用机制、发现结构新颖的抗骨质疏松先导化合物具有重要意义。

熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey. 的干燥根的炮制品,具有补血滋阴、益精填髓等功效,用于遗精、腰膝酸软、消渴、淋证等的治疗<sup>[7]</sup>。现代研究表明熟地黄含有环烯醚萜类、紫罗兰酮类、苯乙醇苷类、三萜类、黄酮类及脂肪酸脂类等多种结构类型的化学成分,具有抗骨质疏松、抗氧化、抗肿瘤、调节免疫和降血糖等多种生物活性<sup>[8-11]</sup>。本课题组前期建立了双荧光素酶标记的 CB2R 调节剂筛选模型,

对熟地黄等 16 味中药进行了筛选,发现熟地黄具有特异性的 CB2R 激动活性。因此,本研究在系统探索熟地黄提取物的 CB2R 激动剂活性的基础上,观察其基于 CB2R 激动活性的对成骨细胞和破骨细胞功能的调控作用,为熟地黄抗骨质疏松机制的深入研究及从中获得以 CB2R 为靶点的抗骨质疏松先导化合物提供科学的依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 3 日龄 Wistar 大鼠,购自浙江中医药大学实验动物研究中心,实验动物许可证号 SCXK(浙)2021-0361。动物饲养于室温( $25 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%~50%的环境中,自由进食饮水。动物实验严格遵守浙江中医药大学伦理规定(批准号 109653-143166)。

### 1.2 细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7(目录号 TCM13)、人类胚胎肾细胞 HEK293(目录号 GNHu43)购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

### 1.3 药材

熟地黄(批号 200501)购自浙江中医药大学饮片有限公司,经浙江中医药大学药学院秦路平教授鉴定为玄参科植物地黄 *R. glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey. 的干燥根的炮制品。

### 1.4 药品与试剂

总 RNA 提取试剂盒(批号 DP419)购自天根生化科技有限公司; NovoScript 逆转录试剂盒(批号 E047-01B)、Novo Start SYBR qPCR Super MixturecDNA 扩增试剂盒(批号 E096-01A)购自

Novoprotein 公司; pIRES2-EGFP、pGL4.29 [luc2P/CRE/Hygro]、pRL-TK9 由上海生工生物工程有限公司合成; DMEM 高糖培养基 (批号 8117161) 购自美国 Gibco 公司;  $\alpha$ -MEM 培养基 (批号 TBD41061) 购自天津灏洋生物制品科技有限公司; Lipofectamine 3000 转染试剂 (批号 2369247) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 磷酸酶蛋白酶抑制剂 (批号 P1045)、Western 及 IP 裂解液 (批号 P0013J)、5 $\times$ 上样缓冲液 (批号 P0015)、脱脂奶粉 (批号 P0216)、Western 一抗稀释液 (批号 P0023A)、牛血清白蛋白 (批号 ST023)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 P0010)、30%丙酮酰胺溶液 (批号 ST003)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8, 批号 ST788)、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8, 批号 ST768)、过硫酸铵 (批号 ST005)、TEMED (批号 ST728)、DAPI 染色液 (批号 061819191015)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (批号 121820210416)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒 (批号 121820210416) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL, 批号 0615612F1322) 购自杭州联科生物技术股份有限公司; Tris (批号 A501492-0500)、甘氨酸 (批号 A502065-0500) 购自上海生工生物技术有限公司; 胎牛血清 (批号 10091-148)、腺苷酸环化酶激活剂 forskolin (批号 S1612)、CB2R 反向激动剂 AM630 (批号 GC10147)、青霉素-链霉素 (批号 15140-122) 购自美国 GLP BIO 公司; 人环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 检测试剂盒 (批号 MM-0006H1) 购自酶免生物有限公司; 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒 (批号 SKK0946) 购自日本 Wako 公司; ECL 显色液 (批号 1925901) 购自美国 Millipore 公司; CCK-8 增殖检测试剂盒 (批号 ab228554)、CB2R 选择性激动剂 HU308 (批号 ab254226)、成骨细胞特异基因 Osterix 兔多克隆抗体 (批号 ab22552)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 兔单克隆抗体 (批号 ab214050)、p38 兔单克隆抗体 (批号 ab182453)、I 型胶原蛋白 (type I collagen, COL-1) 兔单克隆抗体 (批号 ab138492) 购自英国 Abcam 公司; 基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 兔多克隆抗体 (批号 BA2202) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 成骨特异性转录因子 2 (runt-related transcription

factor 2, Runx2) 兔多克隆抗体 (批号 12556S)、活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, NFATc1) 兔单克隆抗体 (批号 8032S)、c-Fos 兔单克隆抗体 (批号 2250S)、p-p38 兔单克隆抗体 (批号 4511S) 购自美国 CST 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔多克隆抗体 (批号 AF7021)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 S0001) 购自美国 Affinity 公司。

## 1.5 仪器

RE-2000A 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); XP105 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器公司); 智能数显多功能油水浴 (巩义市予华仪器有限责任公司); ORW1.5S-5E 型微波动态萃取设备 (南京澳润微波科技有限公司); 离心机、低温高速离心机、二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 双垂直电泳仪、凝胶成像系统、荧光定量 PCR 仪器 (美国 Bio-Rad 公司); 多功能酶标仪 (美国 Bio-Tec 公司); 荧光相差倒置显微镜 (日本 Nikon 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

成骨细胞提取自 1 日龄 Wistar 大鼠的颅骨, 用含 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素双抗的  $\alpha$ -MEM 培养基, HEK293 细胞和 RAW264.7 细胞用含 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞融合至 80%左右进行传代。

### 2.2 CB2R 双荧光素酶筛选体系的建立

使用 Primer Express 软件 (Application Biosystems) 设计 CB2R 标志基因的引物对, 以 GAPDH 基因作为内参, 合成 Eco RI 黏结端和 Bam HI 黏结端的单链 ERE 齐聚物, 并对其进行退火处理, 形成双链分子。Eco RI 和 Bam HI 双酶切分离双链寡聚体, 用 T4DNA 连接酶连接, 克隆到 pIRES2-EGFP 载体上荧光素酶编码区的上游。

将 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个 HEK293 细胞接种于 60 mm 培养皿中, 培养 12 h 后, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞, 然后用 Lipofectamine 3000 试剂进行转染。混合液中含有检测报告质粒、编码荧光素酶的对照报告质粒和效应质粒, 转染质粒比例 pIRES2-EGFP-CB2R : pGL4.29 [luc2P/CRE/Hygro] : pRL-TK = 2  $\mu$ g : 10  $\mu$ g : 1  $\mu$ g。转染 24 h 后, 更换为含 G418 (800  $\mu$ g/mL)

和潮霉素(400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的培养基,3 d 更换1次培养基,2周左右得到稳定转染的细胞株。随机选取96孔板中的60个孔,30个孔为一组,每孔接种 $5 \times 10^3$ 个HEK293细胞后,分别加入含有1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  forskolin的培养基作为阳性对照,含0.1% DMSO空白培养液作为空白对照,孵育6 h后测量双荧光素酶的发光值,以相对荧光素酶发光值即萤火虫荧光素酶化学发光值/海肾荧光素酶化学发光值,表示细胞CB2R的表达水平。高通量筛选系统定量评价指标包括信号本地比、信号窗、信噪比、信号本底变异系数、Z'因子等,以确保其高效、准确地应用于高通量数据收集。

### 2.3 熟地黄提取物的制备及其对CB2R的激动活性分析

**2.3.1 熟地黄提取物的制备** 取5 g熟地黄粉末于250 mL圆底烧瓶中,加入50 mL纯水,加热回流1 h,倾出上层清液,再加入50 mL纯水加热回流1 h,合并煎液后,用布氏漏斗滤过,将滤液减压浓缩定容至10 mL,得到生药量为0.1 g/mL的水提取物。采用《中国药典》2020版一部中熟地黄质量标准项下方法测定指标性成分含量,熟地黄提取物中地黄苷D质量分数为0.15%。

**2.3.2 熟地黄提取物对CB2R的激动作用分析** 将HEK293-CB2R细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔接种于6孔板,细胞贴壁后,饥饿培养24 h,用500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熟地黄提取物处理6 h,测定双荧光素酶发光值。

**2.3.3 对CB2R激动作用的特异性检测** 将HEK293-CB2R细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔接种于6孔板,细胞贴壁后,饥饿培养24 h,用500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熟地黄提取物,同时不加或者添加1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  CB2R反向激动剂AM630处理细胞6 h,测定双荧光素酶化学发光值。

**2.3.4 细胞内cAMP水平的测定** 按“2.3.3”项下方法处理细胞,培养结束后,加入100  $\mu\text{L}$  IP裂解液,裂解30 min,收集细胞上清,按照试剂盒说明书测定细胞内cAMP水平。

### 2.4 熟地黄提取物对成骨细胞的作用研究

**2.4.1 CCK-8检测细胞活性** 将大鼠颅骨细胞以 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,用500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熟地黄提取物和1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  HU308处理细胞;在考察CB2R依赖性时,用1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  CB2R反向激动剂AM630预处理30 min,再用500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熟地黄提取物或1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  HU308处理细胞。培养

48 h后,加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液培养30 min,测定450 nm处的吸光度(A)值。

**2.4.2 ALP活性测定和染色** 大鼠颅骨细胞按“2.4.1”项下方法处理,培养7 d后,按照试剂盒说明书测定ALP活性。弃去培养液,用预冷的PBS冲洗细胞2次,加入ALP染色液,37  $^{\circ}\text{C}$ 染色30 min,弃去染液,蒸馏水冲洗3次,于显微镜下观察拍照。

**2.4.3 成骨细胞骨矿化结节的诱导及茜素红ARS染色** 大鼠颅骨细胞按“2.4.1”项下方法处理,培养14 d后,用预冷的PBS冲洗细胞2次,于3.7%甲醛中固定10 min,用含40 mmol/L茜素红的ARS染料(pH 4.2)染色10 min,于光学显微镜下观察成骨细胞骨矿化结节的形态和数目。

**2.4.4 成骨细胞周期检测** 大鼠颅骨细胞按“2.4.1”项下方法处理,培养7 d后,药物处理后的成骨细胞离心5 min,弃去上清液,用预冷的PBS洗涤细胞1次,将细胞重悬于1 mL细胞周期检测试剂A和10  $\mu\text{L}$ 试剂B中,涡旋10 s,室温孵育30 min,采用流式细胞仪测定细胞周期。

### 2.5 熟地黄提取物对破骨细胞的作用研究

**2.5.1 CCK-8检测细胞活性** 将RAW264.7细胞以 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,用500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熟地黄提取物和1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  HU308处理细胞;在考察CB2R依赖性时,用1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  CB2R反向激动剂AM630预处理30 min,再用500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熟地黄提取物和1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  HU308处理细胞。培养48 h后,按照CCK-8试剂盒说明书测定细胞活性。

**2.5.2 TRAP活性测定和染色** 将RAW264.7细胞以 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板,细胞贴壁后,用25 ng/mL的RANKL诱导,使其分化为破骨细胞,按“2.5.1”项下方法处理细胞,培养3 d后,以硫代巴比妥钠洗涤细胞2次,每孔加入10  $\mu\text{L}$  0.1% Triton X-100反应10 min,加入TRAP反应液100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,每孔加入100  $\mu\text{L}$  1 mol/L NaOH溶液终止反应,测定405 nm处的A值。用PBS洗涤细胞,每孔加50  $\mu\text{L}$  4%多聚甲醛固定20 min,然后加入50  $\mu\text{L}$  0.2% Triton X-100透化5 min,按TRAP染色试剂盒说明书进行染色,于显微镜下观察拍照。

**2.5.3 破骨细胞F-肌动蛋白(F-actin)环的免疫荧光染色** 将 $5 \times 10^4$ 个RAW264.7细胞接种于共聚焦培养皿(直径35 mm)中,培养24 h,按“2.5.1”项下方法处理5 d,用4%多聚甲醛固定30 min,用5 g/mL鬼笔环肽在37  $^{\circ}\text{C}$ 下染色40 min,用PBS洗

涤,再用 4',6'-二氨基-2-苯基吲哚在室温下染色 10 min,于激光共聚焦显微镜下观察破骨细胞的 F-actin 环结构。

### 2.6 Western blotting 检测 CB2R、成骨相关蛋白和破骨相关蛋白表达

按“2.4.1”项和“2.5.1”项下方法处理后,提取成骨细胞或破骨细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,用 5%脱脂牛奶封闭后,分别加入 CB2R 抗体(1:500)、GAPDH 抗体(1:1000)、成骨相关蛋白抗体(1:1000)和破骨相关蛋白抗体(1:1000),4℃孵育过夜;加入相应二抗(1:1000),37℃孵育 1 h,用 MONAD QuickChemi 5100 化学发光成像系统分析条带。

### 2.7 统计分析

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据采用 prism 9.0 软件包进行统计分析,多重比较数据采用单因素方差分析和 Dunnett-*t* 检验。

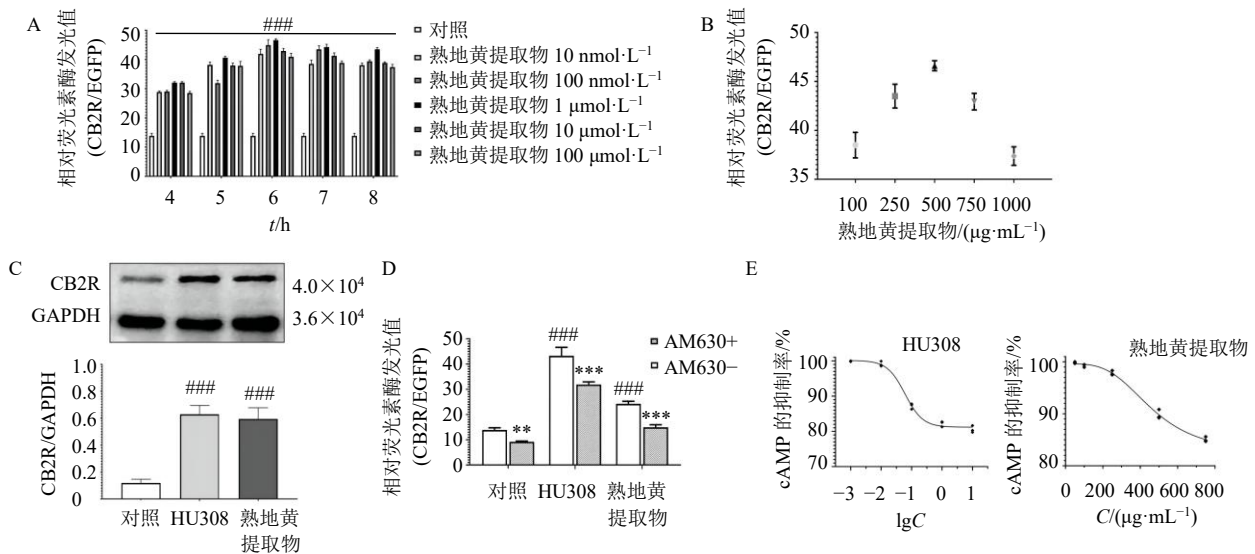
## 3 结果

### 3.1 熟地黄提取物的 CB2R 激动活性分析

本研究建立了一种基于双荧光素酶的高通量筛选模型来检测 CB2R 和熟地黄提取物之间的相互作用。

应用构建的 HEK293-CB2R 细胞体系评价其筛选 CB2R 调节剂的性能,发现信号本底值为 4.8,信噪比为 31.1,表明本底水平对高通量筛选的结果无显著影响。forskolin 阳性对照组和 DMSO 空白对照信号平均值和标准偏差分别为 (63.3±4.4)% 和 (13.1±1.6)%,信号窗为 50.2%,信号本底变异系数分别为 7.0%和 7.6%,*Z'* 因子为 0.64,表明本模型性能较好,具有较高的可行性和可靠性。

为了验证该系统在筛选 CB2R 激动剂方面的可行性,检测了 CB2R 激动剂 HU308 处理的 HEK293-CB2R 细胞的相对荧光素酶活性,如图 1-A 所示,与只转染空载体的 HEK293 细胞相比,HU308 显著增加了相对荧光素酶的活性 ( $P < 0.001$ ),1 μmol/L HU308 作用 6 h 后相对荧光素酶发光值最高。本课题组前期利用双荧光素酶筛选模型对 16 种中药提取物进行筛选后,发现熟地黄提取物的 CB2R 激动活性可能具有特异性。如图 1-B 所示,100、250、500、750、1000 μg/mL 熟地黄提取物作用于 HEK293-CB2R 细胞 6 h 后,以 500 μg/mL 熟地黄提取物作用效果最明显。因此,后续研究中,用 500 μg/mL 熟地黄提取物观察其 CB2R 激动活性及对骨代谢的调控作用。如图 1-C 所示,1 μmol/L HU308



A-HU308 对 HEK293-CB2R 细胞双荧光素酶活性分析 B-熟地黄提取物对 HEK293-CB2R 细胞 CB2R 双荧光素酶活性的影响 C-熟地黄提取物对 HEK293-CB2R 细胞 CB2R 蛋白表达的影响 D-AM630 对 HU308 和熟地黄提取物在 HEK293-CB2R 细胞中 CB2R 激动活性的逆转作用 E-熟地黄提取物对 HEK293-CB2R 细胞 cAMP 的抑制作用 与对照组比较: #### $P < 0.001$ ; 与无 AM630 的同组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$   
A-double luciferase luminescence analysis of HU308 on HEK293-CB2R cells B-effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* extract on double luciferase activity of HEK293-CB2R cells C-effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* extract on CB2R protein expression in HEK293-CB2R cells D-reversal effect of AM630 on CB2R agonistic activity of HU308 and *Rehmanniae Radix Praeparata* extract in HEK293-CB2R cells E-inhibitory effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* extract on cAMP level in HEK293-CB2R cells #### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs same group without AM630

图 1 熟地黄提取物对 CB2R 的激动作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Agonistic activities of *Rehmanniae Radix Praeparata* on CB2R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



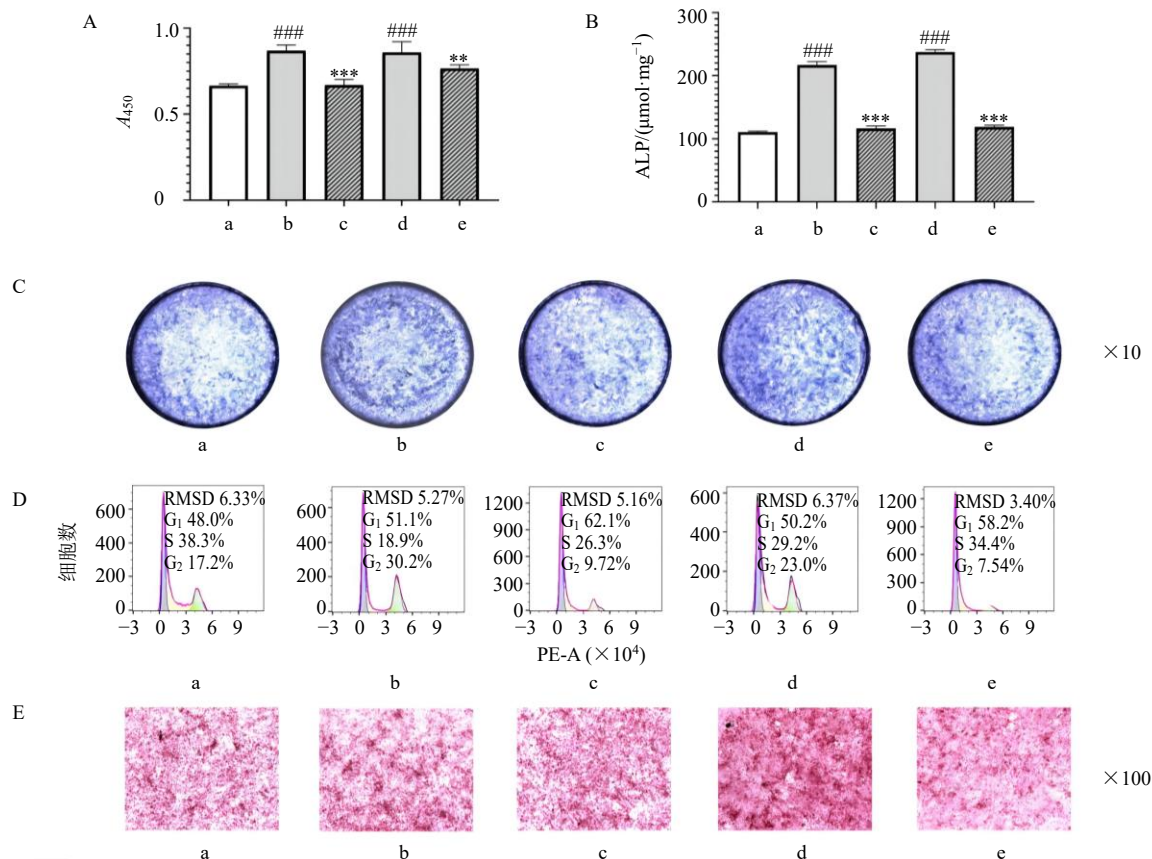
和 500 μg/mL 熟地黄提取物均能显著上调 HEK293-CB2R 细胞 CB2R 蛋白表达 ( $P < 0.001$ )。

进一步用 CB2R 反向激动剂 AM630 确证熟地黄提取物 CB2R 激动活性的特异性,如图 1-D 所示,用 AM630 预先处理 HEK293-CB2R 细胞 30 min,可以逆转 HU308 和熟地黄提取物对 HEK293-CB2R 细胞 CB2R 的激动作用 ( $P < 0.001$ ),表明熟地黄具有特异性的 CB2R 激动活性。CB2R 通过与 G 蛋白偶联抑制细胞中腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 的活性,抑制细胞 cAMP 的产生。本研究用 forskolin 刺激 HEK293-CB2R 细胞,使细胞内 cAMP 含量增加,再用 CB2R 激动剂 HU308 或熟地黄提取物处理细胞,测定细胞内 cAMP 含量。如图 1-E 所示, HU308 和熟地黄提取物均能够抑制 forskolin 刺激的 HEK293-CB2R 细胞中 cAMP 的产生,其半数

抑制浓度 (half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 值分别为 60.57 nmol/mL 和 ( $482.3 \pm 59.9$ ) μg/mL。

### 3.2 熟地黄以 CB2R 为靶点促进成骨细胞的骨形成作用

如图 2 所示, CB2R 选择性激动剂 HU308 和熟地黄提取物可促进成骨细胞的增殖、ALP 活性和骨矿化结节的形成 ( $P < 0.001$ )。熟地黄提取物作用成骨细胞后,  $G_1$  期细胞比例降低, S 期及  $G_2$  期细胞比例增加,表明熟地黄提取物可能通过驱动细胞周期从  $G_1$  期过渡到 S 期及  $G_2$  期来促进成骨细胞的增殖 (图 2-D)。CB2R 反向激动剂 AM630 能降低熟地黄提取物对成骨细胞骨形成的促进作用 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 逆转熟地黄提取物对成骨细胞周期的调节作用,表明熟地黄提取物在一定程度上以 CB2R 相关的方式发挥增强成骨细胞的骨形成作用。



A-成骨细胞增殖 B-成骨细胞 ALP 活性 C-成骨细胞 ALP 染色 D-成骨细胞细胞周期分析 E-成骨细胞骨矿化结节的茜素红染色 a-对照组 b-HU308 组 c-HU308+AM630 组 d-熟地黄提取物组 e-熟地黄提取物+AM630 组 与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与无 AM630 的同组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下同

A-proliferation of osteoblasts B-ALP activity of osteoblasts C-ALP staining of osteoblasts D-analysis of cell cycle of osteoblasts E-Alizarin red staining for osteoblastic bone mineralized nodules a-control group b-HU308 group c-HU308 + AM630 group d-*Rehmanniae Radix Praeparata* extract group e-*Rehmanniae Radix Praeparata* extract + AM630 group # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs same group without AM630, same as below figures

图 2 熟地黄提取物基于 CB2R 对成骨细胞骨形成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* extract on bone formation of osteoblasts based on CB2R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 熟地黄提取物对成骨细胞 CB2R 及骨形成相关蛋白表达的影响

如图 3 所示, 熟地黄提取物和 HU308 显著增加成骨细胞 CB2R 的表达 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), AM630 预处理可以降低其对成骨细胞 CB2R 蛋白表达的促进作用 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。熟地黄提取物和 HU308 可显著上调成骨细胞骨形成关键蛋白 COL-1、OPN、Runx2 和 Osterix 的表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),

AM630 预处理能够逆转熟地黄提取物和 HU308 对成骨细胞关键蛋白表达的上调作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。CB2R 与 p38/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路联系密切, 熟地黄提取物和 HU308 可显著降低成骨细胞中 p38 的表达 ( $P < 0.05$ ), AM630 预处理后可以逆转熟地黄提取物和 HU308 对成骨细胞 p38 表达的影响 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

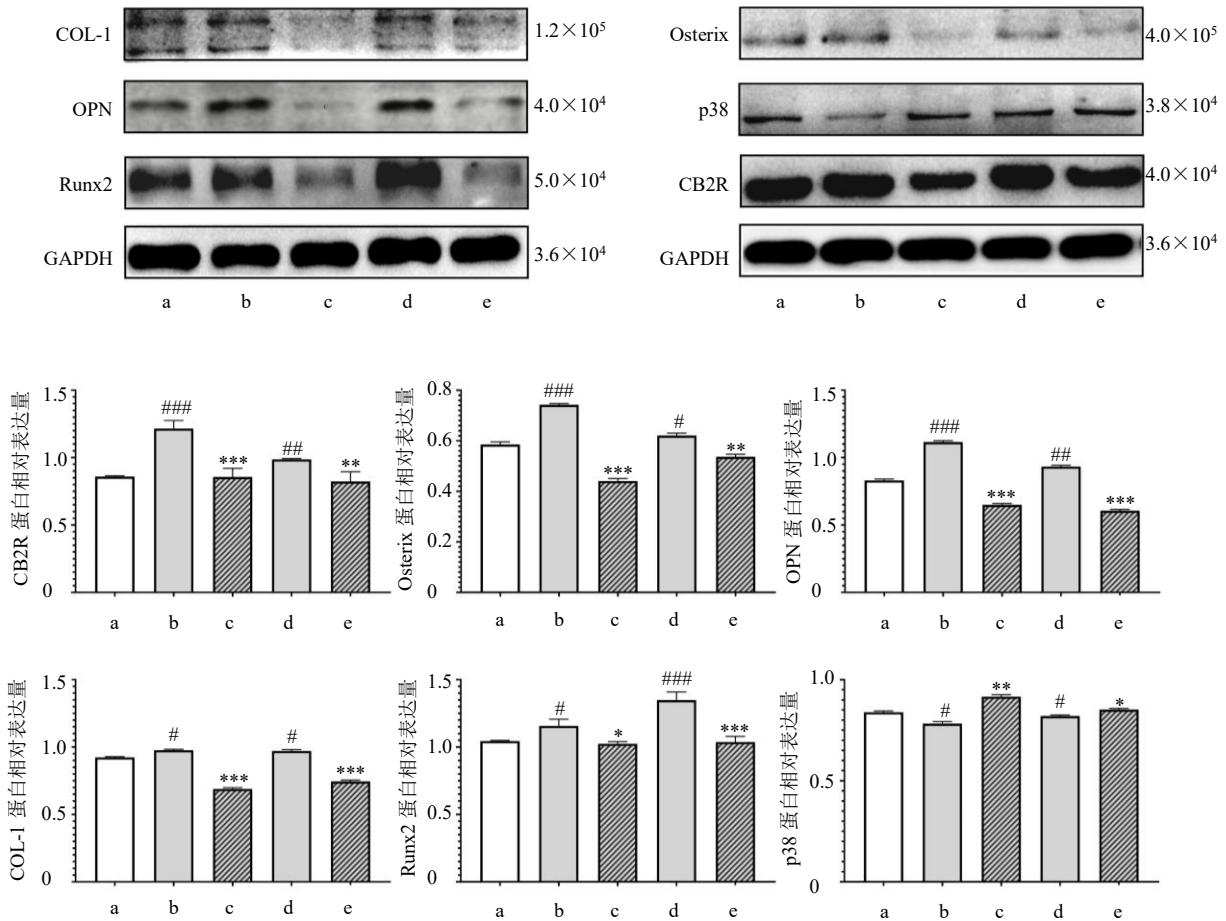


图 3 熟地黄提取物对成骨细胞 CB2R 及骨形成相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

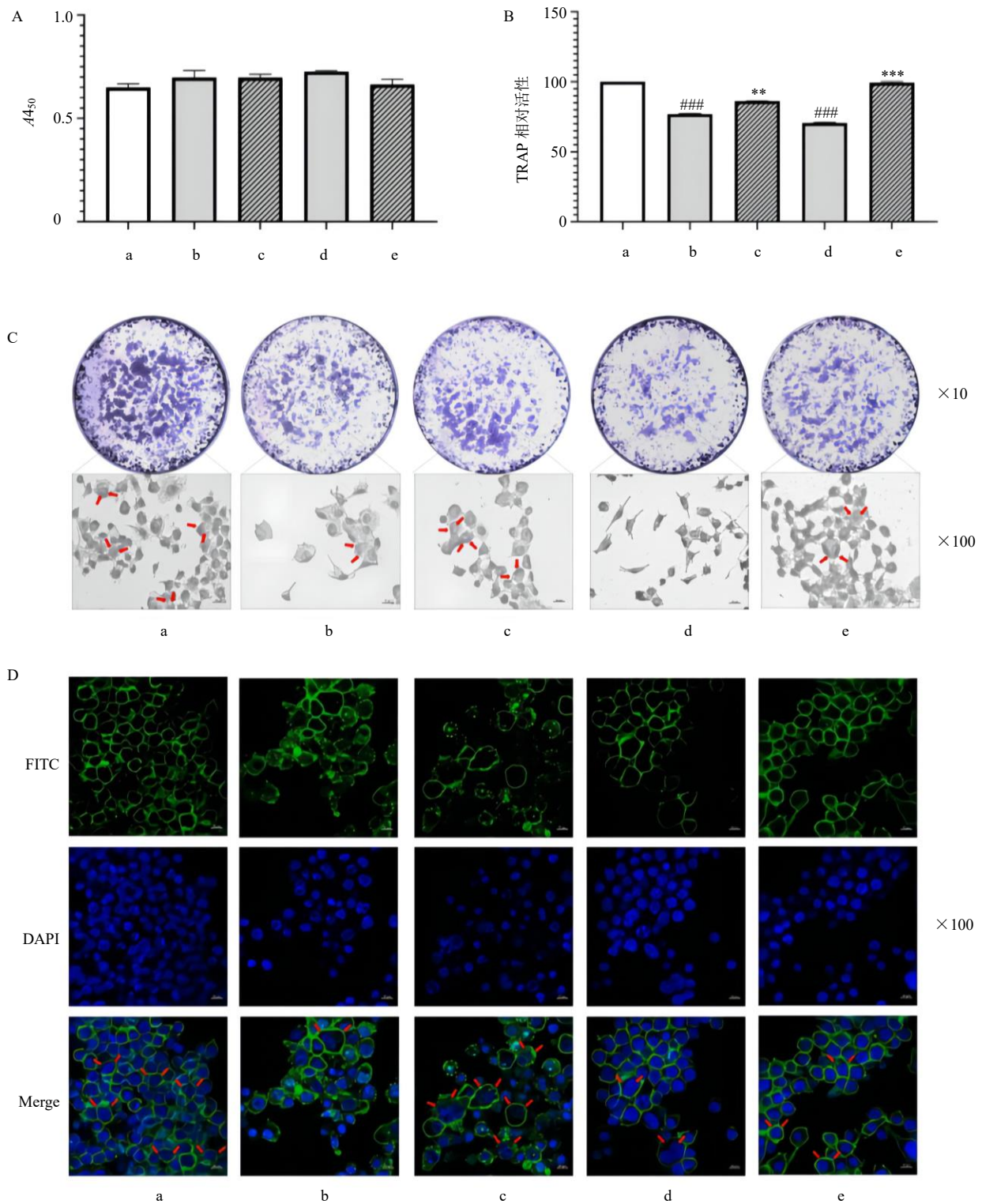
Fig. 3 Effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* extract on expressions of CB2R and bone formation-related proteins in osteoblast ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 熟地黄提取物以 CB2R 为靶点抑制破骨细胞形成和分化的作用

如图 4-A~C 所示, HU308 和熟地黄提取物作用 72 h 对 RAW264.7 细胞的活性没有显著的影响, 但可显著抑制由 RAW264.7 细胞诱导的破骨细胞中 TRAP 酶的活性 ( $P < 0.001$ ), 减少 TRAP 染色阳性破骨细胞的数目。

F-actin 环是破骨细胞中形成的微管和微丝结

构, 在骨矿物质基质的密封区形成和骨吸收中发挥关键作用。如图 4-D 所示, HU308 和熟地黄提取物处理 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞 5 d 后, 荧光显微镜下可见破骨细胞 F-actin 环的厚度变薄, 结构不完整。CB2R 反向激动剂 AM630 可显著降低熟地黄对破骨细胞 TRAP 活性及其形成分化的抑制作用 ( $P < 0.001$ ), 逆转其对破骨细胞 F-actin 环形成的抑制作用。



A-RAW264.7 细胞的增殖 B-破骨细胞 TRAP 活性 C-破骨细胞 TRAP 酶染色 (红色箭头表示成熟的破骨细胞) D-破骨细胞 F-actin 环染色 (红色箭头表示破骨细胞的 F-actin 环)

A-proliferation of RAW264.7 cells B-TRAP activity of osteoclast C-TRAP staining of osteoclast (red arrows indicate mature osteoclasts) D-F-actin ring staining for osteoclast (red arrows indicate F-actin ring staining of mature osteoclast)

图 4 熟地黄提取物基于 CB2R 对 RAW264.7 细胞诱导的破骨细胞形成分化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* extract on formation and differentiation of osteoclast induced from RAW264.7 cells based on CB2R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



### 3.5 熟地黄提取物对破骨细胞 CB2R 及骨吸收相关蛋白表达的影响

如图 5 所示, 熟地黄提取物可显著增加破骨细胞 CB2R 的表达 ( $P < 0.05$ ), AM630 能够逆转其对破骨细胞 CB2R 表达的激动作用 ( $P < 0.001$ )。NFATc1 和 c-Fos 是破骨细胞形成分化的关键转录因

子, MMP9 是破骨细胞分泌的降解骨基质的关键蛋白酶。熟地黄提取物显著抑制破骨细胞 MMP9、NFATc1 和 c-Fos 的表达及 p38 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), AM630 能够逆转其对破骨细胞内 NFATc1、MMP9、c-Fos 及 p-p38 表达的抑制作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

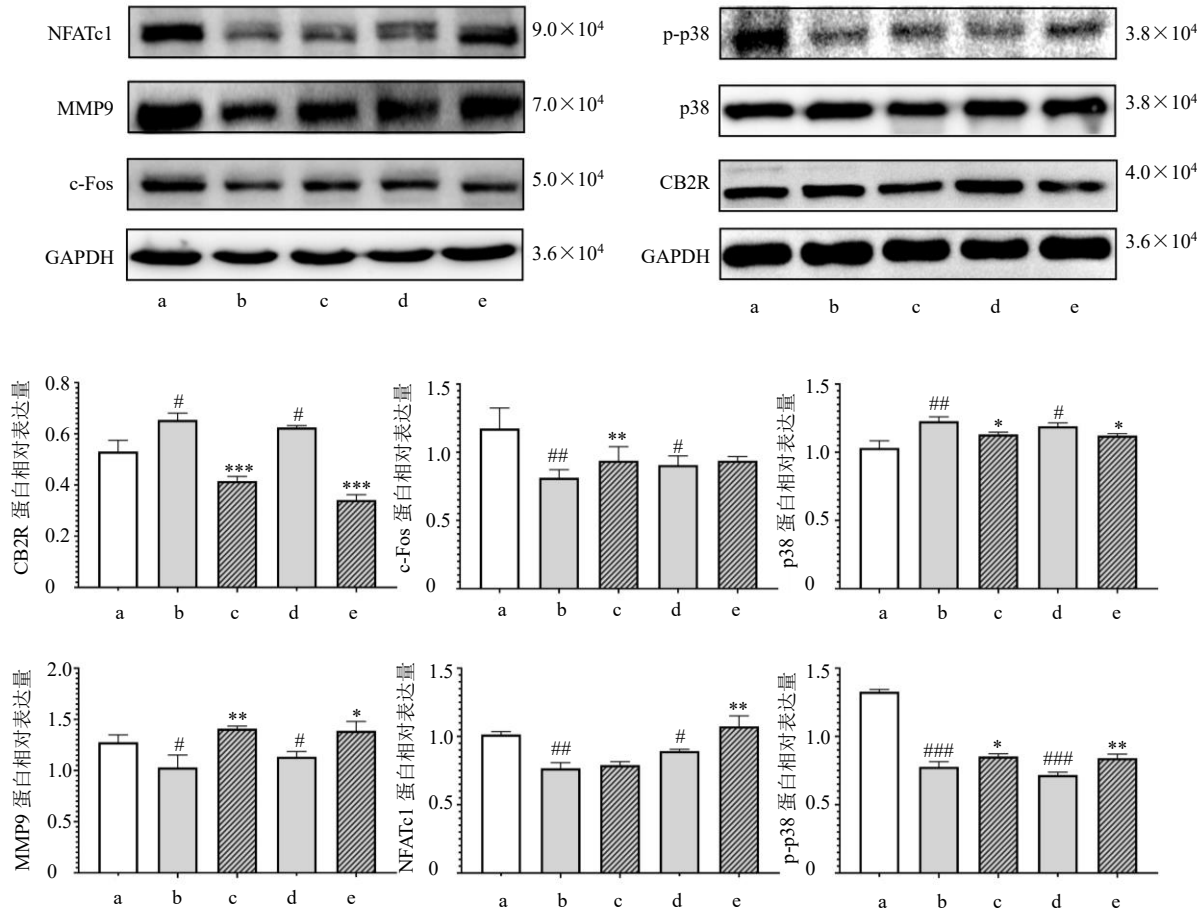


图 5 熟地黄提取物对破骨细胞 CB2R 及骨吸收相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* extract on expressions of CB2R and bone resorption-related proteins of osteoclast ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 4 讨论

本研究应用稳定、可靠的双荧光素酶报告基因的 CB2R 调节剂筛选体系分析了熟地黄提取物对 CB2R 的特异性激动活性及其对成骨和破骨细胞功能的调节作用, 发现熟地黄对 CB2R 具有特异的激动作用, 可促进成骨细胞的增殖、ALP 活性、骨矿化结节形成及骨形成关键蛋白的表达, 抑制破骨细胞的形成分化、TRAP 活性及骨吸收关键蛋白的表达, 并且熟地黄对成骨细胞和破骨细胞功能的调节作用可被 CB2R 反向激动剂 AM630 逆转, 表明熟

地黄可能以 CB2R 为靶点发挥调控骨代谢的作用。

本研究应用转染 CB2R 的 HEK293 细胞筛选具有 CB2R 激动活性的中药, 并通过在仅转染 EGFP 的 HEK293 细胞及应用 CB2R 反向激动剂明确熟地黄提取物对 CB2R 的激动活性的特异性。同时, 考虑到激活 CB2R 可抑制 AC 活性导致细胞内 cAMP 的水平降低, 通过观察熟地黄提取物对转染 CB2R 的 HEK293 细胞内 cAMP 水平的抑制作用, 发现其抑制细胞内 cAMP 的  $IC_{50}$  值为  $(482.3 \pm 59.9) \mu\text{g/mL}$ , 进一步确证了熟地黄的 CB2R 激动活性。

成骨细胞是体内参与骨形成的功能细胞,可表达 CB2R。CB2R 选择性激动剂如 HU308 等也表现出确切的调节成骨细胞功能的作用<sup>[12]</sup>。研究发现,CB2R 激动剂  $\beta$ -石竹烯呈剂量相关性显著增加骨髓细胞诱导的成骨细胞的矿化,抑制骨髓细胞向脂肪细胞的分化<sup>[13]</sup>。CB2R 部分激动剂厚朴酚能够保护 MC3T3-E1 成骨细胞免受抗霉素 A 的细胞毒作用,促进成骨细胞增殖、ALP 活性及骨基质矿化<sup>[14]</sup>。本研究发现熟地黄提取物可通过激活 CB2R 调控成骨细胞 CB2R/p38 通路,调节细胞周期来促进成骨细胞的增殖、矿化及骨形成相关蛋白的表达,CB2R 反向激动剂 AM630 可以逆转熟地黄提取物对成骨细胞的作用,表明熟地黄提取物通过激活 CB2R 抑制 p38 信号通路促进成骨细胞的增殖与矿化和骨形成作用。

破骨细胞是唯一具有骨吸收活性的功能细胞,CB2R 激动剂直接作用于破骨细胞,抑制其形成、分化和骨吸收作用。CB2R 部分激动剂甲基厚朴酚可显著抑制 RANKL 诱导的多核破骨细胞的形成和破骨细胞 F-actin 环的形成,抑制破骨细胞 c-Fos、NFATc1 及 p38 相关通路的激活<sup>[15]</sup>;CB2R 激动剂梓木酸显著抑制破骨细胞 F-actin 环的形成,进而抑制破骨细胞性骨吸收<sup>[16]</sup>。本研究发现熟地黄提取物能够减少 RANKL 诱导的破骨细胞的数量、破骨细胞的分化及 F-actin 环的形成,降低破骨细胞特异性蛋白 MMP9、NFATc1 及 c-Fos 的表达,抑制破骨细胞 CB2R 的表达和 p38 的磷酸化,CB2R 反向激动剂 AM630 可逆转熟地黄提取物对破骨细胞的作用,表明熟地黄提取物通过激活 CB2R,干预 p38 相关通路,降低 p38 的磷酸化水平,从而抑制破骨细胞的形成与分化和骨吸收活性。

熟地黄为抗骨质疏松中药方剂中使用频率最高的中药,含有环烯醚萜苷、苯乙醇苷、紫罗兰苷及脂肪酸类成分,对绝经后骨质疏松、糖尿病性骨质疏松、老年性骨质疏松及糖皮质激素诱导的骨质疏松症均有良好的防治作用<sup>[17]</sup>。研究发现,熟地黄中环烯醚萜苷类成分梓醇通过蛋白酪氨酸激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /信号传导转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 途径促进人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,在颅骨缺损的去卵巢模型大鼠中可促进骨骼再生和血管形成<sup>[18-19]</sup>;苯丙素苷类成分毛蕊花糖苷能够抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞向破骨细

胞分化,抑制成熟破骨细胞的骨吸收,并可以减轻去卵巢诱导的骨丢失<sup>[20]</sup>。本研究发现,熟地黄提取物可通过 CB2R 调控成骨细胞和破骨细胞的功能,表明熟地黄通过多成分、多靶点和多途径发挥调控骨代谢的作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Bukke V N, Archana M, Villani R, *et al.* Pharmacological and toxicological effects of phytocannabinoids and recreational synthetic cannabinoids: Increasing risk of public health [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(10): 965.
- [2] Smoum R, Baraghithy S, Chourasia M, *et al.* CB2 cannabinoid receptor agonist enantiomers HU-433 and HU-308: An inverse relationship between binding affinity and biological potency [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(28): 8774-8779.
- [3] Bai J X, Ge G R, Wang Y J, *et al.* A selective CB2 agonist protects against the inflammatory response and joint destruction in collagen-induced arthritis mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 109025.
- [4] Apostu D, Lucaciu O, Mester A, *et al.* Cannabinoids and bone regeneration [J]. *Drug Metab Rev*, 2019, 51(1): 65-75.
- [5] Tian F, Yang H T, Huang T, *et al.* Involvement of CB2 signalling pathway in the development of osteoporosis by regulating the proliferation and differentiation of hBMSCs [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2426-2435.
- [6] Russell C, Rueda S, Room R, *et al.* Routes of administration for Cannabis use-basic prevalence and related health outcomes: A scoping review and synthesis [J]. *Int J Drug Policy*, 2018, 52: 87-96.
- [7] Zhang R X, Li M X, Jia Z P. *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 199-214.
- [8] Xu L, Kwak M, Zhang W, *et al.* *Rehmannia glutinosa* polysaccharide induces toll-like receptor 4 dependent spleen dendritic cell maturation and anti-cancer immunity [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(7): e1325981.
- [9] Liu C Y, Ma R F, Wang L L, *et al.* *Rehmanniae Radix* in osteoporosis: A review of traditional Chinese medicinal uses, phytochemistry, pharmacokinetics and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 351-362.
- [10] Huang Y E, Nan L, Xiao C W, *et al.* Optimum preparation method for self-assembled PEGylation nano-adjuvant based on *Rehmannia glutinosa* polysaccharide and its immunological effect on macrophages [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 9361-9375.

- [11] 杜珂, 高晓霞, 王锋, 等. 基于药效物质基础的熟地黄质-效评价研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1477-1484.
- [12] Ofek O, Karsak M, Leclerc N, *et al.* Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(3): 696-701.
- [13] Mlost J, Kac P, Kędziora M, *et al.* Antinociceptive and chondroprotective effects of prolonged  $\beta$ -caryophyllene treatment in the animal model of osteoarthritis: Focus on tolerance development [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 204: 108908.
- [14] Li Y W, Kong D J, Ahmad A, *et al.* Targeting bone remodeling by isoflavone and 3, 3'-diindolylmethane in the context of prostate cancer bone metastasis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33011.
- [15] Rempel V, Fuchs A, Hinz S, *et al.* Magnolia extract, magnolol, and metabolites: Activation of cannabinoid CB2 receptors and blockade of the related GPR55 [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 4(1): 41-45.
- [16] Lee D, Yu J S, Huang P, *et al.* Identification of anti-inflammatory compounds from Hawaiian noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit juice [J]. *Molecules*, 2020, 25(21): 4968.
- [17] Xu R, Luo C, Ge Q W, *et al.* *Radix Rehmanniae Praeparata* promotes bone fracture healing through activation of TGF- $\beta$  signaling in mesenchymal progenitors [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110581.
- [18] Chen L, Zhang R Y, Xie J, *et al.* STAT3 activation by catalpol promotes osteogenesis-angiogenesis coupling, thus accelerating osteoporotic bone repair [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 108.
- [19] Wan D, Yang X, Wang Y, *et al.* Catalpol stimulates VEGF production via the JAK2/STAT3 pathway to improve angiogenesis in rats' stroke model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 191: 169-179.
- [20] Lee S Y, Lee K S, Yi S H, *et al.* Acteoside suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis by inhibiting c-Fos induction and NF- $\kappa$ B pathway and attenuating ROS production [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80873.

[责任编辑 李亚楠]