

葛根素对成骨细胞增殖及骨形态发生蛋白的影响

路立花 杨 莉 徐玉荣

(河北省眼科医院口腔种植科, 邢台, 054000)

摘要 目的:探讨葛根素对成骨细胞增殖及骨形态发生蛋白的影响。方法:采用血清药理学方法制备葛根素含药血清,分为葛根素组、阳性对照组和阴性对照组。从SD大鼠乳鼠颅骨获取成骨细胞,分别用含药血清培养分离得到的成骨细胞。采用CCK-8检测成骨细胞增殖、酶联免疫吸附试验检测骨形态发生蛋白2(BMP-2)的表达;采用微量酶标法检测碱性磷酸酶的活性。结果药物作用24、48和72 h后,葛根素组D值显著高于阴性对照组($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组($P < 0.05$)。随着时间的增加,葛根素组和阳性对照组D值在药物作用48 h达到最高,至72 h后有下降趋势。药物作用3 d和7 d后,葛根素组BMP-2表达水平均显著高于阴性对照组($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组($P < 0.05$)。药物作用3 d和7 d后,葛根素组BMP-2表达水平均显著高于阴性对照组($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组($P < 0.05$)。药物作用3 d和7 d后,葛根素组碱性磷酸酶活性均显著高于阴性对照组($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组($P < 0.05$)。结论葛根素可能通过诱导BMP-2表达促进增殖,活化碱性磷酸酶活性促进生物矿化。

关键词 骨质疏松症;葛根素;成骨细胞;增殖;骨形态发生蛋白2

Effects of Puerarin on Osteoblast Proliferation and Bone Morphogenetic Protein

Lu Lihua, Yang Li, Xu Yurong

(Department of Somatology of Hebei Eye Hospital, Xingtai 054000, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of puerarin on osteoblast proliferation and bone morphogenetic protein. **Methods:** The serum containing puerarin was prepared by serum pharmacological method, and divided into puerarin group, positive control group and negative control group. Osteoblasts were extracted from SD rat skull, and osteoblasts were cultured with corresponding serum. CCK-8 was used to detect osteoblast proliferation. The expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The activity of alkaline phosphatase was detected by micro-enzyme method. **Results:** The values of D in puerarin group were significantly higher than those of the negative control group at 24, 48 and 72 hours ($P < 0.05$), and were significantly lower than those in positive control group ($P < 0.05$). With the increase of time, the D value of puerarin group and positive control group reached the highest at 48 h, and decreased after 72 h. The expression of BMP-2 in puerarin group was significantly higher than that of the negative control group ($P < 0.05$), and was significantly lower than that in positive control group ($P < 0.05$). The expression of BMP-2 in puerarin group was significantly higher than that of the negative control group ($P < 0.05$), and was significantly lower than that of the positive control group ($P < 0.05$). The activity of alkaline phosphatase in puerarin group was significantly higher than that of the negative control group ($P < 0.05$), and significantly lower than that of the positive control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Puerarin may promote the proliferation and activate alkaline phosphatase activity by promoting BMP-2 expression to promote biomineralization.

Key Words Osteoporosis; Puerarin; Osteoblasts; Proliferation; Bone morphogenetic protein 2

中图分类号: R284; R361 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.09.037

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是一种常见病,主要表现为骨量的减少,使患者骨折的危险性不断的增加,在老年人和绝经期妇女中尤为常见^[1]。OP主要包括原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症和特发性骨质疏松症3类^[2]。成骨细胞在骨形成过程中具有重要作用,具有相关物质的分泌、基质的合成和骨组织矿化的作用^[3]。当成骨细胞增殖分化程度降低或受抑制时,容易发生OP。既往研究显示,葛

根素具有促进成骨细胞增殖的作用,然而其确切的机制还不十分清楚^[4-5]。鉴于此,本研究观察葛根素对大鼠成骨细胞增殖和骨形态发生蛋白2(BMP-2)表达水平的影响,旨在为葛根素临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雄性SD大鼠30只,体重160~180 g(上海实验动物中心提供)。普通饲养环

境,随机分为葛根素组、阳性对照组和阴性对照组(生理盐水组),每组 10 只。出生 1~3 d 的 SD 乳鼠 10 只。

1.2 主要试剂 α -MEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);磷酸盐缓冲液(PBS 液,美国 sigma 公司);2.5 g/L 胰酶(美国 Hyclone 公司);青霉素、链霉素液(碧云天生物技术研究所);细胞增殖-毒性检测试剂盒(CCK-8,上海邦奕生物科技有限公司);碱性磷酸酶测试盒(碧云天生物技术研究所);大鼠 BMP-2 酶联免疫分析试剂盒(上海和序生物科技有限公司)。

1.3 主要实验仪器 Synergy2 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);超净工作台(AIRTECH,苏州净化设备有限公司);紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂);BS223S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系列有限公司);台式低温高速冷冻离心机(太仓市医疗械厂)。

1.4 实验药物及含药血清 葛根素为本实验室制备产品,经 HPLC 验证纯度在 99.9% 以上。40 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 3 d 后,葛根素组、阳性对照组和阴性对照组分别灌胃给药,2 次/d,连续 5 d。第 5 天末次给药 1 h 后,腹腔注射 10 mg/L 戊巴比妥钠,采集腹主动脉血,4 °C 放置 2 h 后离心(1 000 r/min \times 10 min),分离血清。混合同组老鼠所制备的血清,灭活(56 °C, 30 min),0.22 μ m 滤膜过滤后储存于 -20 °C 冰箱。按人-大鼠体表面积比值法折算计算大鼠葛根素给药剂量。

1.5 大鼠成骨细胞的获取 1)准备实验用品:包括眼科剪、一次性培养板、培养基、消化瓶(20 mL)、细胞筛、消化液、冰块。2)取 10 只出生 1~3 d 的 SD 乳鼠,75% 医用乙醇浸泡后放入洁净操作台。取出颅骨,放入冰冷的 D-Hanks 液中,剔除附着的结缔组织,PBS 清洗 3 次,放入 α -MEM 培养基。3)将颅骨用小剪刀剪为 0.5~1.0 mm³ 大小,加入 5 mL 2.5 g/L 胰酶消化。4)将磁转子放入消化瓶内,37 °C 孵箱消化 20 min,弃掉上清液。5)继续将 5 mL 消化液加入到消化瓶中,37 °C 孵箱消化 20 min,弃掉上清液,加入含有 10% 的小牛血清的培养基终止消化。6)合并消化液,用 200 目细胞筛过滤离心(1 000 r/min \times 5 min),弃上清。加入含体积分数 1% 双抗的 α -MEM 培养基和体积分数 12% 胎牛血清重悬细胞,吸管吹打,洗涤沉淀,离心(1 000 r/min \times 5 min),弃上清。接种后 37 °C 孵箱培养,24 h 后换液。7)取出培养瓶,悬浮液于 50 mL 离心管中进行细胞计数。

8)按实验需求,采用 1:3 进行传代培养。将 2~5 代细胞用于实验。

1.6 成骨细胞的鉴定

1.6.1 形态观察 培养 24 h 后,在倒置显微镜下观察其生长状态及形态。

1.6.2 苏木精-伊红(HE)染色 采用 HE 染色法,BMP-2 鉴定心肌细胞。1)将洁净载玻片消毒后,事先将用多聚赖氨酸处理过的盖玻片置于培养板内,将心肌细胞接种于培养板进行培养。2)培养 72 h 后,取出盖玻片,4 °C PBS 冲洗 3 次。4% 多聚甲醛固定 20 min,PBS 冲洗 3 次。蒸馏水清洗 3 次。3)加入 10% 山羊血清,37 °C 孵育 30 min,去除多余血清,加入一抗(兔抗 1:100),PBS 清洗 3 次。4)加入生物素标记的二抗(山羊抗兔),37 °C 孵育 30 min,PBS 清洗 3 次。5)加入辣根过氧化物酶标记链酶卵白素,37 °C 孵育 30 min,PBS 清洗 3 次。6)DAB 显色 2~5 min。7)自来水冲洗终止染色。70%~80%~95%~100% 的乙醇逐级脱水,各 5 min。8)中性树脂胶封片,晾干后拍照并保存。9)荧光显微镜下拍摄图片。

1.7 CCK-8 检测成骨细胞增殖 取 3~4 代生长良好的细胞,2.5 g/L 胰酶消化后,用含体积分数 1% 双抗的 α -MEM 培养基和体积分数 12% 胎牛血清重悬细胞,按 1×10^6 /L 接种于 6 孔板中,24 h 后更换为含体积分数为 10% 的葛根素组、阳性对照组含药血清及和阴性对照组血清培养细胞,7 d 后收集细胞,取上清检测碱性磷酸酶,严格按说明书操作,于酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度。

1.8 BMP-2 检测 取 3~4 代生长良好的细胞,2.5 g/L 胰酶消化后,用含体积分数 1% 双抗的 α -MEM 培养基和体积分数 12% 胎牛血清重悬细胞,按 1×10^6 /L 接种于 6 孔板中,24 h 后更换为含体积分数为 10% 的葛根素组、阳性对照组含药血清及和阴性对照组血清培养细胞,7 d 后收集细胞,于培养的第 3 天、7 天收集上清,取上清 BMP-2 表达水平,严格按说明书操作。

1.9 碱性磷酸酶活性检测 取 3~4 代生长良好的细胞,2.5 g/L 胰酶消化后,用含体积分数 1% 双抗的 α -MEM 培养基和体积分数 12% 胎牛血清重悬细胞,按 1×10^6 /L 接种于 6 孔板中,24 h 后更换为含体积分数为 10% 的葛根素组、阳性对照组含药血清及和阴性对照组血清培养细胞,7 d 后收集细胞,于培养的第 3 天、7 天收集上清,取上清检测碱性磷酸酶活性检测,严格按说明书操作,于酶标仪 490 nm

波长处测定吸光度。

1.10 统计学方法 统计分析所有资料采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析处理。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较应用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞的鉴定 BMP-2 是成骨细胞特异性表达蛋白,图 2 为 BMP-2 单克隆抗体染色的结果。经免疫细胞化学染色后,成骨细胞形态均呈短梭形、三角形或多边形,核仁清晰,核蓝紫色,细胞质出现棕黄色颗粒,为阳性反应。

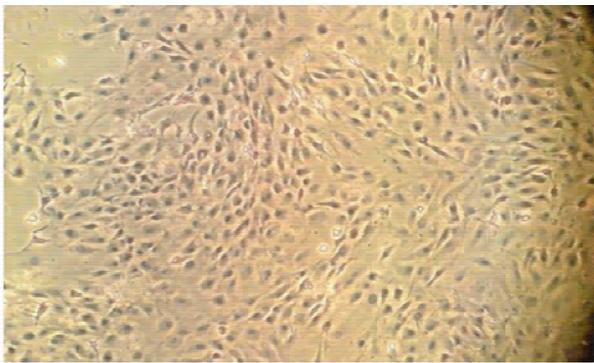


图 1 成骨细胞免疫细胞化学鉴定 (×100)

2.2 成骨细胞增殖 药物作用 24、48 和 72 h 后,葛根素组 A 值显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组 ($P < 0.05$)。随着时间的增加,葛根素组和阳性对照组 A 值在药物作用 48 h 达到最高,至 72 h 后有下降趋势。

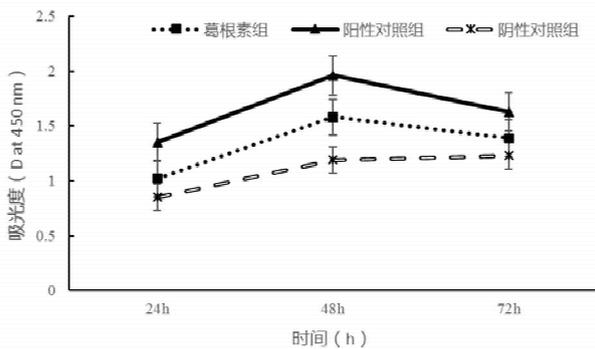


图 2 葛根素含药血清对大鼠成骨细胞增殖的影响

2.3 BMP-2 表达水平 药物作用 3 d 和 7 d 后,葛根素组 BMP-2 表达水平均显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 碱性磷酸酶活性 药物作用 3 d 和 7 d 后,葛根素组碱性磷酸酶活性均显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组 ($P < 0.05$)。见图 4。

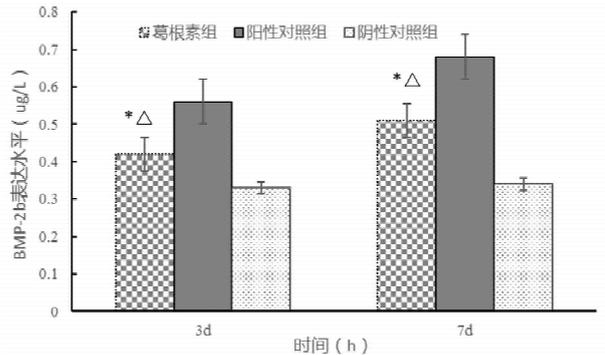


图 3 葛根素含药血清对大鼠成骨细胞 BMP-2 表达水平的影响

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,Δ $P < 0.05$

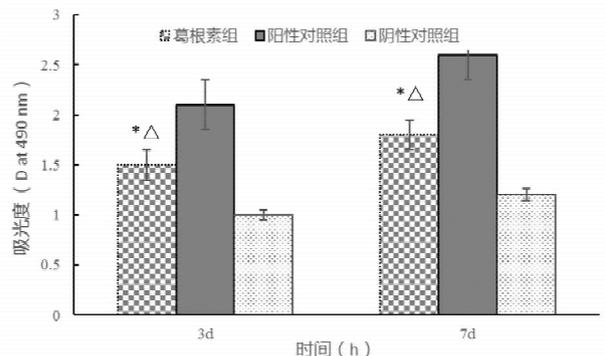


图 4 葛根素含药血清对大鼠成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,Δ $P < 0.05$

3 讨论

葛根素一种从中药葛根中提取的异黄酮化合物,属于植物雌激素,具有保护缺血心肌、扩张血管、改善心脑血管等作用^[6]。既往大量研究表明,葛根素具有促进成骨细胞增殖的作用,可显著提高碱性磷酸酶的活性^[7-8]。绝经后 OP 是 OP 的重要类型之一,雌激素替代疗法在其治疗过程中具有重要作用,但由于该类药物存在乳房胀痛、阴道出血、子宫内膜增生等严重不良反应限制了其进一步临床应用^[9]。植物雌激素在具备良好的骨细胞保护作用前提下,不良反应轻,是一种最具潜力的雌激素替代药物。

本研究采用 CCK-8 比色法检测葛根素对大鼠成骨细胞增殖作用的影响,数据显示,药物作用 24、48 和 72 h 后,葛根素组 A 值显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组 ($P < 0.05$),表明葛根素对成骨细胞的增殖作用具有促进作用。同时,既往研究表明,高药物浓度的葛根素可能对成骨细胞存在一定的细胞毒作用^[10]。本研究发现,随着

时间的增加,葛根素组和阳性对照组 A 值在药物作用 48 h 达到最高,至 72 h 后有下降趋势,推测可能也是由于随着时间的延长,葛根素可能会抑制成骨细胞的增殖,或是产生了细胞毒作用。张莹莹等^[11]报道称,葛根素干预成骨细胞后期碱性磷酸酶活性明显增加,表明葛根素具有促进成骨细胞增值和生物矿化的作用。孙玉敏等^[12]报道称葛根素对成骨细胞的增殖促进作用呈剂量依赖性,且作用具有双向性。本文结果与以上报道相似。因此,葛根素对成骨细胞的增殖作用具有促进作用是有双向作用的。

葛根素化学名为 4,7-二羟基 8-β-D 吡喃葡萄糖醛基异黄酮,是葛根提取物的主要成分之一。既往研究对其促进成骨细胞增殖作用的机理展开了研究,认为葛根素能调节成骨特异转录因子,够诱导一氧化氮和骨形态发生蛋白 2 的合成,促进核因子-κB 受体和骨保护素活化,从而发挥促进成骨细胞增殖的作用^[13-14]。本组数据显示,药物作用 3 d 和 7 d 后,葛根素组 BMP-2 表达水平均显著高于阴性对照组($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组($P < 0.05$);药物作用 3 d 和 7 d 后,葛根素组碱性磷酸酶活性均显著高于阴性对照组($P < 0.05$),且显著低于阳性对照组($P < 0.05$),表明葛根素可能通过诱导 BMP-2 表达促进增殖,活化碱性磷酸酶活性促进生物矿化。BMP-2 是骨形态发生蛋白中重要的一种,属于转化生长因子-β 家族。在骨组织形成过程中,BMP-2 通过旁分泌和自分泌的方式在细胞间传递信息,从而起到调节成骨细胞增殖的作用^[15-16]。碱性磷酸酶是一种成骨细胞分化的特异性标志物,可反映成骨细胞矿化功能。成骨细胞通过分泌钙盐晶体和碱性磷酸酶到细胞外基质中,高含量的碱性磷酸酶水平促进基质钙化^[17]。

综上所述,葛根素可能通过诱导 BMP-2 表达促进增殖,活化碱性磷酸酶活性促进生物矿化。但这一作用呈剂量依赖性,高浓度葛根素可能对成骨细胞具有细胞毒作用,从而抑制其增殖。

参考文献

[1] 孙玉敏,许晓琳,杨怡,等. 葛根素可促进老年女性骨质疏松症患者成骨细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究,2015,19(29):4593-4597.

[2] Gomes MF, Valva VN, Vieira EM, et al. Homogenous demineralized dentin matrix and platelet-rich plasma for bone tissue engineering in cranioplasty of diabetic rabbits: biochemical, radiographic, and histological analysis[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2016, 45(2):255-

266.

[3] 孙玉敏,黄冬冬,程才,等. 葛根素对体外培养老年女性骨质疏松症患者成骨细胞碱性磷酸酶及骨钙素的影响[J]. 武警后勤学院学报:医学版,2015,24(10):775-778,849.

[4] Yang YH, Li B, Zheng XF, et al. Oxidative damage to osteoblasts can be alleviated by early autophagy through the endoplasmic reticulum stress pathway—implications for the treatment of osteoporosis[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 77:10-20.

[5] Schulze M, Weisel K, Grandjean C, et al. Increasing bone sclerosis during bortezomib therapy in multiple myeloma patients; results of a reduced-dose whole-body MDCT study[J]. AJR Am J Roentgenol, 2014, 202(1):170-179.

[6] 孙玉敏,许晓琳,程才,等. 葛根素对体外培养的人老年女性骨质疏松症成骨细胞分化的初步研究[J]. 现代生物医学进展,2015,15(34):6649-6652.

[7] Wang Y, Yang C, Xie WL, et al. Puerarin concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and interleukin-6 production in human osteoblastic MG-63 cells[J]. Phytomedicine, 2014, 21(8-9):1032-1036.

[8] Tiyasatkulkovit W, Malaivijitnond S, Charoenphandhu N, et al. Pueraria-mirifica extract and puerarin enhance proliferation and expression of alkaline phosphatase and type I collagen in primary baboon osteoblasts[J]. Phytomedicine, 2014, 21(12):1498-1503.

[9] Lv H, Che T, Tang X, et al. Puerarin enhances proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells via a nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2):2283-2290.

[10] Yu D, Mu S, Zhao D, et al. Puerarin attenuates glucocorticoid-induced apoptosis of hFOB1.19 cells through the JNK-and Akt-mediated mitochondrial apoptotic pathways[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(2):345-354.

[11] 张莹莹,周建斌,曾祥伟,等. 葛根素对成骨细胞增殖能力及靶向 Runx2 的 miRNA 的影响[J]. 中国药理学通报,2016,32(10):1457-1462.

[12] 孙玉敏,许晓琳,杨怡,等. 葛根素可促进老年女性骨质疏松症患者成骨细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究,2015,19(29):4593-4597.

[13] 吴琳琳,王彦,郑雅心,等. 葛根素对人牙周膜干细胞成骨分化的作用[J]. 中国美容医学,2013,22(10):1067-1071.

[14] 黄雄峰,汪建民. 葛根素的神经保护作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):224-230.

[15] 钱康琦,孙玉明,詹秀琴. 实时荧光定量 PCR 法研究葛根素对成骨细胞 TGF-β1 及 Smad2/3 mRNA 表达的影响[J]. 辽宁中医学院学报,2013,15(9):46-49.

[16] 姜丽,余兰彬,徐国良,等. 天麻素和葛根素在大鼠体内联合应用的药理学研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(6):1179-1184.

[17] Li B, Liu H, Jia S. Zinc enhances bone metabolism in ovariectomized rats and exerts anabolic osteoblastic/adipocytic marrow effects ex vivo[J]. Biol Trace Elem Res, 2015, 163(1-2):202-207.

(2017-05-03 收稿 责任编辑:杨觉雄)