

· 论 著 ·

杜仲叶通过激活 ERK 及 AKT 磷酸化促进大鼠成骨细胞增殖的研究

张立超 邓鸣涛 戴鹏 陈伟才 方宁 陈林攀 杜川 罗军 刘荣华

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)03-0217-04

摘要: 目的 研究杜仲叶提取物对大鼠成骨细胞的增殖作用及其分子机制。方法 选取新生 SD 大鼠的乳鼠颅骨通过消化法分离出乳鼠成骨细胞,并用碱性磷酸酶染色进行细胞鉴定;先用杜仲叶提取物分别以 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml 五种不同浓度梯度对大鼠成骨细胞干预, 2 d 后用 MTT 方法检测细胞增殖情况;用无血清无酚红的培养基饥饿大鼠成骨细胞 2 h 后, 分别以 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml 五种不同浓度杜仲叶提取物干预大鼠成骨细胞, 2 h 后 Western blot 检测 ERK 和 AKT 的活化情况。结果 碱性磷酸酶染色后的成骨细胞呈紫红色(特异性染色), MTT 法结果显示杜仲叶提取物促进大鼠成骨细胞的增殖, 并具有浓度依赖性; Western blot 结果显示杜仲叶提取物可使 ERK 及 AKT 磷酸化水平提高, 并具有浓度依赖性。结论 杜仲叶提取物通过 ERK 通路及 AKT 通路促进大鼠成骨细胞的增殖。

关键词: 杜仲叶; 成骨细胞; ERK; AKT; 增殖

Eucommia leaf promotes rat osteoblast proliferation by activating the phosphorylation of ERK and AKT ZHANG Lichao, DENG Mingtao, DAI Peng, et al. The Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi College of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

Corresponding author: LUO Jun, Email: luojun1786@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of the extraction of eucommia leaves on rat osteoblast proliferation and the molecular mechanism. **Methods** The osteoblasts were isolated and cultured from the calvaria of new-born SD rats. The cells were identified with alkaline phosphatase staining. Rat osteoblasts were treated with 5 different concentration gradients of leaf extraction: 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 60 mg/ml, and 100 mg/ml. Cell proliferation was detected using MTT method 2 days later. After the addition of serum-free and phenol red-free medium for 2 h, 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 60 mg/ml, or 100 mg/ml leaf extraction was added to the medium of the osteoblast culture. Then the expression of ERK and AKT was detected using Western blotting 2 hours later. **Results** After alkaline phosphatase staining, osteoblasts were stained in purple (specific staining). The results of MTT methods showed that leaf extraction promoted rat osteoblast proliferation in a dose-dependent manner. The results of Western blotting showed that leaf extraction could improve the phosphorylation levels of ERK and AKT in a dose-dependent manner. **Conclusion** The extraction of eucommia leaves promotes rat osteoblast proliferation through ERK and AKT pathways.

Key words: Eucommia leaf; Osteoblast; ERK; AKT; Proliferation

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv) 是我国传统中药, 性味甘温而补, 入肝、肾经, 药力颇强。善温补肝

肾而强筋骨、安胎, 兼降血压。既为治肾虚腰膝酸痛或筋骨无力之要药, 又为治肝肾亏虚胎漏或胎动之佳品。临床广泛用于防治骨科疾病。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞, 负责骨基质的合成、分泌和矿化。由骨髓间充质干细胞分化而来, 在骨的形成过程中要经历成骨细胞增殖, 细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和成骨细胞凋亡四个阶段, 其过程受多种因素影响, 最终调控形成骨组织。骨重建过程包括

基金项目: 国家自然科学基金(81160508); 江西省自然科学基金(GZY0170)

作者单位: 330006 南昌, 南昌大学第二附属医院(张立超、邓鸣涛、戴鹏、陈伟才、方宁、陈林攀、杜川、罗军); 江西中医学院(刘荣华)

通讯作者: 罗军, Email: luojun1786@163.com

破骨细胞贴附在旧骨区域,分泌酸性物质溶解矿物质,分泌蛋白酶消化骨基质,形成骨吸收陷窝;其后,成骨细胞移行至被吸收部位,分泌骨基质,骨基质矿化而形成新骨。破骨与成骨过程的平衡是维持正常骨量的关键。临床上一些以骨丢失为特征的疾病(如骨质疏松等),由于多种因素造成成骨细胞增殖活性降低,破骨细胞相对活跃,从而造成骨吸收,骨破坏。本研究发现杜仲叶通过激活 ERK 和 AKT 磷酸化活性从而促进大鼠成骨细胞的增殖,为临床杜仲治疗骨质疏松等骨丢失性疾病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

1.1.1 实验动物:选取新生 24~48 h SD 大鼠乳鼠,雌雄不限(由南昌大学医学实验动物中心提供)。

1.1.2 实验药物:杜仲叶提取物由江西中医学院刘荣华教授实验室提供。提取大致步骤:取新鲜干燥杜仲叶(*Eucommia ulmoides* Oliv.),切丝,于 60℃ 条件下干燥后,细磨成粉末,用 70% 乙醇提取 2 次,第一次用 10 倍量乙醇回流提取一小时,第二次用 8 倍量乙醇回流提取一小时,合并两次提取液,回流乙醇即得。每公斤烘干后杜仲叶粉末得一公斤浸膏。称取适量浸膏,搅拌均匀以充分溶解,加入 DMEM 液,再次搅拌均匀,充分溶解后过滤除菌,混匀后依次配成含杜仲叶提取物 5 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml 的不同浓度的试剂,4℃ 保存备用。

1.1.3 实验试剂:DMEM 低糖培养基、无酚红高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(南美产)购自 Hyclone; p-p44/42 MAPK (T202/Y204) (D13.14.4E) (#4370S)、phospho-AKT (ser473) 购自 cell signaling technology 公司, AKT/1/2/3 (sc-8321)、ERK1 (sc-93)、二抗 goat-anti-mouse (sc-2005)、goat-anti-rabbit (sc-2040) 均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, 鼠 β -Actin 抗体、MTT 粉末购自康为世纪; DMSO、胰蛋白酶及 II 型胶原酶购自 solarbio, 碱性磷酸酶染色试剂盒购自 SIGMA 公司。

1.2 乳鼠成骨细胞的分离、培养、鉴定

选取新生 24~48 h SD 大鼠乳鼠 4 只,颈椎脱臼处死后,浸入 75% 医用酒精中 10 min, 无菌操作台中取颅盖骨,置于含 PBS 的 10 cm 直径培养皿中,充分剔除附着于颅骨面上的软组织,并用 PBS 清洗 3 遍,后将颅盖骨剪成 1×1 mm 的碎块,加入 3 ml 胰蛋白酶,37℃ 震荡消化 30 min,离心去酶后加入 3 ml II 型胶原酶震荡消化 30 min,加入 10% 胎牛血清 DMEM 终止消化,离心去酶后加入 4 ml 10% 胎牛血

清 DMEM 充分吹打,吹打均匀后种于 60 mm 直径培养皿中,37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养,72 h 后,更换新鲜培养液,去除未贴壁细胞及部分杂质,以后每 3d 换液,细胞融合 80% 的时候 1:2 传代,第三代成骨细胞进行碱性磷酸酶细胞染色。

1.3 MTT 法检测细胞增殖

将 MTT 粉末避光条件下以磷酸缓冲液(PBS)为溶媒配置成浓度为 5 mg/ml 的 MTT 液,振荡器震荡充分混匀,过滤器过滤后置于 10 ml 离心管中避光保存,将第 3 代无血清的成骨细胞均液均匀种于 96 孔板中,每孔 20 μ l, 2000~6000 个细胞,37℃、5% CO₂、无血清低糖 DMEM 条件下饥饿 1 d 后,设五组分别加入浓度梯度为 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml 的杜仲叶提取物,每组设 6 个副孔,并设调零孔,继续孵育 24 h 后弃去培养液,并用 PBS 冲洗 3 遍,以避免药物与 MTT 液反应,每孔加入 20 μ l MTT 溶液,继续孵育 4 小时后每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪在 490 nm 处检测 OD 值。

1.4 Western blot 方法

铺板 50% 密度的细胞于 60 mm 培养皿,第二天用无血清无酚红的培养基饥饿大鼠成骨细胞 2 h 后,设 A、B、C、D、E 五组分别以 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml 五种不同药物浓度干预大鼠成骨细胞,杜仲干预 2h 后把加有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液至于冰上,收集细胞,提取总蛋白,4℃ 12000 r/m 离心 10 min,取上清液,使用 BCA 试剂在波长为 560 nm 条件下测定蛋白 OD 值。取适量蛋白样品(约 30 μ g 左右)进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温下振荡孵育封闭 1 h。加入一抗 4℃ 过夜孵育, TBST 洗膜三次,每次 10 min,然后二抗室温孵育 1 h,再 TBST 洗膜三次,每次 10 min,最后 ECL 显色。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 进行统计学分析。

2 结果

2.1 大鼠成骨细胞的鉴定

乳鼠成骨细胞原代培养后第 3 天(图 1),细胞分布均匀,呈长梭形,培养基内含少量杂质。第 3 代细胞用碱性磷酸酶(ALP)进行细胞染色(图 2),呈紫红色,具特异性,从而确定我们获取的细胞为大鼠成骨细胞。

可见大鼠成骨细胞呈贴壁生长,形态多为梭形



图 1 大鼠成骨细胞形态图

Fig. 1 Morphology of the rat osteoblast

或不规则形,胞浆透明,核仁 1~2 个,符合大鼠成骨细胞的形态学特征。

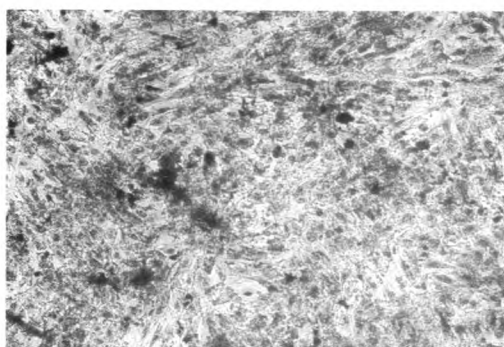


图 2 第 3 代成骨细胞碱性磷酸酶染色后细胞形态图

Fig. 2 Morphology of alkaline phosphatase-stained 3-passage osteoblasts

碱性磷酸酶 (ALP) 为成骨细胞分化的早期特征,其表达随着细胞分化的发展而增强,可作为鉴别成骨细胞的标准,实验结果显示:细胞呈紫红色,ALP 染色即阳性反应,证实成骨细胞具有分泌 ALP 活性,符合成骨细胞生物学特性。

2.2 杜仲叶促进大鼠成骨细胞的增殖并激活 AKT 和 ERK

MTT 法检测杜仲叶提取物对大鼠成骨细胞增殖的影响,实验中我们发现杜仲叶提取物对可以促进大鼠成骨细胞的增殖,值得关注的是其浓度在 60 mg/ml 时作用最大并具有浓度依赖性(图 3);同时杜仲叶提取物可以激活 AKT 及 ERK 的磷酸化,药物浓度在 0 mg/ml~60 mg/ml 作用逐渐递增并具有浓度依赖性,同样浓度在 60 mg/ml 时作用最大(图 4)。

图 3 示 分别以 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml 五种浓度的杜仲叶提取物对大鼠成骨细胞进行干预,结果示成骨细胞增殖随药物浓度增高而增高。

不同药物浓度对大鼠成骨细胞的增殖作用影响

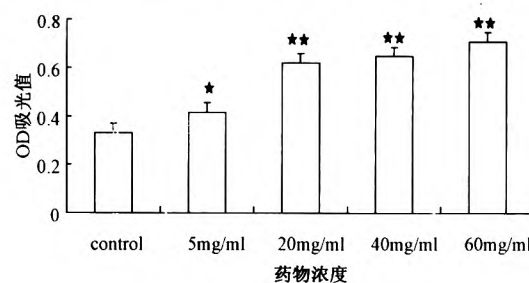


图 3 不同药物浓度对大鼠成骨细胞的增殖作用影响

Fig. 3 The effect of the drug with different doses on proliferation of rat osteoblasts

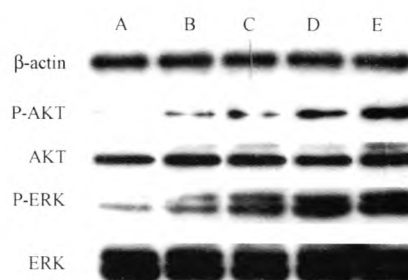


图 4 不同药物浓度对大鼠成骨细胞 AKT 及 ERK 磷酸化的影响

Fig. 4 The effect of the drug with different doses on AKT and ERK phosphorylation of rat osteoblasts

图 4 示 A、B、C、D、E 分别是用 0 mg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml 五种浓度的杜仲叶提取物干预的成骨细胞。无酚红无血清 DMED 饥饿大鼠成骨细胞 2 h 后,分别加以 5 种不同药物浓度的杜仲叶提取物,2 h 后收集蛋白,western blot 检测 AKT 及 ERK 活化水平,实验结果如图所示。该实验重复 3 次,图中代表一般性结果。

3 结论与讨论

MAPK/ERK 信号通路及 AKT 信号通路是经典的增殖信号通路。

MAPK 信号通路是细胞增殖调控中最为重要的信号通路,包括 ERK (extracellular signal-regulated kinase)、JNK (c-Jun N-terminal kinase) 和 p38 MAPK/ERK5 三种主要途径,有研究表明:都参与了成骨细胞的细胞增殖和细胞分化,这其中尤以 ERK1/2 在细胞(包括成骨细胞)的转化、增殖以及细胞命运方面最为重要,其具体过程为:多种生长因子与受体结合后,经由 Ras-Raf-MEK-ERK 级联反应,将信号传到细胞内,促进细胞生长和分化。研究表明生长因子的受体主要为酪氨酸激酶受体,在受

体结合生长因子后,其构象发生改变,形成二聚体,同时激活受体的酪氨酸激酶活性,引起自身酪氨酸的磷酸化。磷酸化的酪氨酸可以激活蛋白激酶 C (PKC),或通过与介导蛋白 Grb2 的结合来招募 Ras 蛋白鸟苷酸释放因子 SOS,活化细胞膜内侧的 Ras 蛋白,进而活化 Raf,通过无活性的 Ras-GDP 向有活性的 Ras-GTP 状态的变换,从而将外界信号从跨膜受体传递到下游蛋白激酶中。研究表明,ERK 途径能诱导细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 表达,促进细胞分裂。Yan Yuxian 等在研究中发现通过机械应力对小鼠 MC3T3-E1 细胞系增殖作用是通过 ERK 途径实现的。Zhang W 等在研究中发现胰岛素和胰岛素样生长因子 1 对成骨细胞的增殖和分化作用是通过 ERK 和 AKT 途径实现的。此外,Aleksic V 采用低水平激光照射对成骨细胞的增殖作用也是通过 MAPK/ERK 途径实现的。本实验结果说明杜仲对大鼠成骨细胞的增殖也是通过 ERK 途径实现的,也进一步说明了 ERK 途径是参与成骨细胞增殖信号途径的重要组成部分。

Akt 又称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于 cAMP 依赖的蛋白激酶 A, 蛋白激酶 G, 蛋白激酶 C (AGC) 超家族。它是 Akt 通路中的关键分子,在促进细胞的生长、增殖、抑制细胞凋亡、促使细胞侵袭和转移、促进血管生成、抵抗化疗和放疗中细胞的凋亡等方面起着重要作用。其作用机制主要通过以下途径:(1) 经 PI3K/Akt/mTOR 途径;(2) Akt 磷酸化 P21Cip1/WAF1;(3) Akt 磷酸化 GSK3 (糖原合成激酶-3);(4) Akt 磷酸化 Foxo 家族的 FKHR, FKHL1, AFX;(5) Akt 磷酸化 PDE3B 等。这其中尤以 PI3K/Akt/mTOR 途径在细胞增殖过程中最为重要,PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) 通过激活 PIP₂ (Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate) 磷酸化结合到 PIP₃, PIP₃ 结合到 AKT 的 PH 位, AKT 通过自身结构改变从而暴露氨基酸位点 Thr308 和 Ser473 磷酸化而激活,进而激活其下游 mTOR 调控细胞的生长、新陈代谢、转化和自我吞噬。

我们通过实验研究发现杜仲叶提取物可以促进大鼠成骨细胞的增殖,并且药物浓度区间在 0 mg/ml ~ 60 mg/ml 之间时,成骨细胞增殖率随药物浓度的升高而升高,具有浓度依赖性;与此同时 Western blot 实验结果表明:杜仲叶提取物可以促进 ERK 和 AKT 磷酸化水平,即 p-ERK 和 p-AKT 水平在浓度区间为 0 mg/ml ~ 60 mg/ml 之间随药物浓度升高而升高,具有浓度依赖性。

以上结果表明:杜仲叶通过促进 ERK 和 AKT 的磷酸化的水平,从而促进大鼠成骨细胞的增殖,但杜仲叶提取物是通过哪些上游活化蛋白或者激活哪些其下游信号蛋白发挥作用的,还有待进一步研究。此外,这种增殖作用是否还通过其他信号途径发挥作用或者存在共同的上游激活蛋白也有待证实。杜仲叶作为我国传统中药,有着确切的疗效,但其成分众多,包括:木脂素类、环西醚萜类、苯丙素类、黄酮类、氨基酸和微量元素以及其他成分,其中活性单体成分如绿原酸等是否在其过程中发挥主要作用、亦或是两种单体物质的共同作用,还需进一步筛选证实。这可以使我们更加深入的理解该种药物发挥作用的机制,这不仅可以为我们在临床中应用杜仲治疗骨质疏松的骨丢失性疾病提供理论依据,遵循循证医学的原则,并且还为我们进一步的研究提供新的思路。

【参 考 文 献】

- [1] Shiyong Li, Hetao Bian, Zhe Liu. Chlorogenic acid protects MSCs against oxidative stress by altering FOXO family genes and activating intrinsic pathway. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 674:65-72.
- [2] 陈伟才,罗军. 杜仲提取液诱导骨髓间充质干细胞成骨分化和抑制其成脂肪分化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(10):1960-1964.
- [3] Pierre J Marie, oustapha Kassem. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging and future anabolic. *European Journal of Endocrinology*, 2011, 165: 1-10.
- [4] Abdallah BM, Kassem M. New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. *Bone*, 2012, 50(2):540-5.
- [5] Wang DW, Li Y, Li ZQ. Identification of a male-Specific amplified fragment length polymorphism (AFLP) and a sequence characterized amplified region (SCAR) marker in *eucommia ulmoides* oliv. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(1):857-64.
- [6] Zhang R, Liu ZG, Li C, et al. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. *Bone*. 2009, 45(3):553-9.
- [7] Chappell WH, Steelman LS, Long JM, et al. Franklin RA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*, 2011, 2(3):135-64.
- [8] Linda S. Steelman, William H. Chappell, Stephen L. Abrams. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011, 3(3):192-222.
- [9] Yu-xian Yan, Yuan-wei Gong, Yong Guo, et al. Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS ONE*, 2012, 7:e35709.
- [10] Zhang W, Shen X, Wan C, et al. Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation: differential signaling via Akt and ERK. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(4):297-302.
- [11] Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, et al. Low-level Er: YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci*, 2010, 25(4):559-69.
- [12] Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J*, 1996, 15:6541-6551.

(收稿日期: 2012-10-17)

杜仲叶通过激活ERK及AKT磷酸化促进大鼠成骨细胞增殖的研究

作者: 张立超, 邓鸣涛, 戴鹏, 陈伟才, 方宁, 陈林攀, 杜川, 罗军, 刘荣华
作者单位: 张立超, 邓鸣涛, 戴鹏, 陈伟才, 方宁, 陈林攀, 杜川, 罗军(南昌大学第二附属医院, 南昌, 330006), 刘荣华(江西中医学院)
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis
年, 卷(期): 2013, 19(3)

参考文献(12条)

1. Shiyong Li;Hetao Bian;Zhe Liu [Chlorogenic acid protects MSCs against oxidative stress by altering FOXO family genes and activating intrinsic pathway](#) 2012
2. 陈伟才;罗军 [杜仲提取液诱导羊骨髓间充质干细胞成骨分化和抑制其成脂肪分化](#) 2009(10)
3. Pierre J Marie;oustapha Kassem [Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging and future anabolic](#) 2011
4. Abdallah BM;Kassem M [New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis](#) 2012(02)
5. Wang DW;Li Y;Li ZQ [Identification of a male-Specific amplified fragment length polymorphism\(AFLP\) and a sequence characterized amplified region \(SCAR\) marker in eucommia ulmoides oliv](#) 2011(01)
6. Zhang R;Liu ZG;Li C [Du-Zhong \(Eucommia ulmoides Oliv.\)cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats](#) 2009(03)
7. Chappell WH;Steelman LS;Long JM [Franklin RA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT/m TOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health](#) 2011(03)
8. Linda S. Steelman;William H. Chappell;Stephen L. Abrams [Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT/m TOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging](#) 2011(03)
9. Yu-xian Yan;Yuan-wei Gong;Yong Guo [Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation](#) 2012
10. Zhang W;Shen X;Wan C [Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation: differential signaling via Akt and ERK](#) 2012(04)
11. Aleksic V;Aoki A;Iwasaki K [Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK](#) 2010(04)
12. Alessi DR;Andjelkovic M;Caudwell B [Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1](#) 1996

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201303005.aspx