

淫羊藿苷促进大鼠骨髓基质细胞成骨性分化过程中对 p-AKT 及 eNOS、iNOS 表达量的影响

郭晓宇 葛宝丰 陈克明* 甄平 周建 马小妮
兰州军区兰州总医院骨科研究所,甘肃 兰州 730050

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 09-0897-06

摘要: **目的** 研究淫羊藿苷(Icariin, ICA)促进体外培养大鼠骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)的成骨性分化机理。**方法** 贴壁分离法培养大鼠骨髓基质细胞并用流式检测细胞纯度。骨髓基质细胞传代至第 2 代时分别用含有成骨性诱导剂的 1×10^{-5} mol/L ICA 和 LY294002 处理 24 h 后用 Real-time RT-PCR 检测 ALP、eNOS 和 iNOS 的 mRNA 表达水平, Western blotting 检测 ALP、p-AKT、eNOS 和 iNOS 的蛋白表达量。**结果** 原代骨髓基质细胞体外培养传代至第 2 代时纯度可达 95% 以上。基因和蛋白质检测均显示 ICA 可极显著的促进碱性磷酸酶(ALP)的表达($P < 0.01$), PI3K 的特异性抑制剂 LY294002 会抑制 ICA 对 ALP 的提高, ICA + LY294002 组与 CON 组的表达差别不明显。p-AKT 的蛋白表达变化与 ALP 相似。ICA 可以提高 eNOS 表达($P < 0.01$), 加抑制剂能使其降低($P < 0.01$), 而 iNOS 的 ICA 组与 ICA + LY294002 组无明显差别。**结论** ICA 促进 BMSCs 成骨性分化过程涉及到 PI3K/AKT 通路, 且 AKT 位于 eNOS 的上游; eNOS 和 iNOS 共同作用, 但 iNOS 起主要作用。

关键词: 大鼠骨髓基质细胞; 淫羊藿苷; NOS; AKT

The expression of p-AKT, eNOS and iNOS in the process of ICA promotes osteogenic differentiation of BMSCs

GUO Xiaoyu, GE Baofeng, CHEN Keming, ZHEN Ping, ZHOU Jian, MA Xiaoni

Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital, Gansu Lanzhou, 730050, China

Corresponding author: CHEN Keming, Email: chkeming@yahoo.com.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect mechanism of Icariin (ICA) on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs). **Methods** Rat BMSCs were isolated according to plastic adherence and identified by flow cytometry. The mRNA levels of alkaline phosphatase (ALP), eNOS, and iNOS were detected using quantitative real-time RT-PCR. The protein levels of ALP, p-AKT, eNOS, and iNOS were detected using by Western blotting. **Results** More than 95% of the 2nd passage rat BMSCs were immune positive, with less than 5% were immune negative. The result showed that 10^{-5} mol/L ICA could significantly promote the expression of ALP ($P < 0.01$), while the expression in LY294002 group was lower than that in the ICA group ($P < 0.01$). The expression in ICA + LY294002 group and control group had no significant difference. The protein levels of p-AKT were similar to ALP. The expression of eNOS in ICA group increased ($P < 0.01$), while decreased in LY294002 group ($P < 0.01$). However, no significant difference of protein level was observed between ICA group and ICA + LY294002 group. **Conclusion** ICA promotes osteogenic differentiation of BMSCs, and the PI3K/AKT signal pathway is involved in this process. AKT is located at the upstream of eNOS. eNOS and iNOS both can affect the process, while iNOS may play a major role.

Key words: Rat bone marrow stromal cells; Icariin; Nitric oxide synthase; AKT

随着人口老龄化的到来,骨质疏松的发病率在常见疾病中已跃居第七位^[1],骨质疏松患者易发生骨折,使其生活质量低,骨质疏松是一种严重威胁中

老年健康的常见多发疾病^[2]。我们前期的研究表明中草药淫羊藿的主要有效成分淫羊藿苷具有理想的抗骨质疏松作用^[3],可以促进大鼠骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)的成骨性分化,同时抑制体外培养破骨细胞骨吸收活性^[4],但其机理尚不明确。本课题组研究表明^[5]淫羊藿可以通过激活 NO-cGMP-PKG 信号通路以发挥其促进骨形

基金项目: 甘肃省科技重大专项资助项目(09ZKNKA025)、国家自然科学基金(81270963)

* 通讯作者,Email: chkeming@yahoo.com.cn

成的作用,但对淫羊藿苷促骨髓间充质细胞成骨性分化的一氧化氮通路上游所涉及到的信号通路,以及对 ICA 促进骨形成的初期过程中究竟是哪一亚型的 NOS 起主要作用尚无报道。本实验就一氧化氮亚型在骨形成过程中的参与情况进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

150g 左右 Wistar 雄鼠,购自甘肃中医学院 SPF 级动物实验中心,动物质量合格证号:SCXK(甘)2004-0006-152。

1.2 试剂

DMEM 培养基(Gibco 公司);标准胎牛血清(兰州民海生物工程公司);淫羊藿苷(中国药品生物制品检定所,纯度 > 98%);地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸(ASAP)、胰蛋白酶(Sigma 公司)。RNAiso Reagent、反转录试剂盒(Prime Script™ reagent Kit)、实时定量 PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™ II)、Easy Dilution 稀释液均购自 TaKaRa 公司,引物由 TaKaRa 公司设计合成。BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德公司,兔多克隆抗体 iNOS 购自美国 ABcam 公司,兔多克隆抗体 ALP、p-AKT、eNOS 购自美国 CST 公司、小鼠多克隆抗体 β -actin、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物公司,PVDF 膜购自美国 Pierce 公司。

1.3 主要仪器

CO₂ 细胞培养箱购自美国 Thermo Revco 公司,倒置相差显微镜购自日本 OLYMPUS 公司,紫外分光光度计和台式高速冷冻离心机购自德国 Heraeus 公司,FACScalibur 流式细胞仪购自美国 Becton-Dickinson 公司,蛋白垂直电泳装置购自 Bio-Rad 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

2 方法

2.1 骨髓基质细胞的体外分离

选用 150 g 左右的 Wistar 大鼠脱颈处死后,剥离股骨和胫骨,用 DMEM 培养基(含 10% 的胎牛血清)冲洗骨髓腔,收集细胞悬液,150 目的细胞筛过滤得到单细胞悬液。调整细胞浓度约为 1.0×10^7 个/mL,接种培养,37℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养,每 72 h 换一次液,待细胞铺满皿底 80% 时,用 0.25% 胰酶消化,调整细胞浓度约为 1×10^5 细胞/ml 接种培养,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下

进行培养,每 72 h 换一次液,培养至细胞融合成单层后,0.25% 胰酶消化后传两代得到 P2 代,待其长至接近完全融合后进行药物处理。

2.2 大鼠骨髓基质细胞的鉴定

取 P2 对数生长期的细胞,先用 PBS 冲洗两遍,分别用 PE 标记的 CD45 抗体和 CD90 抗体与 FITC 标记的 CD44 抗体标记骨髓基质细胞,将细胞置入含 10 μ L 上述抗体的 PBS 中,于室温避光静置 30 min,再用预冷的 PBS 洗 3 遍,最后加入 500 μ L PBS,流式检测细胞的纯度。CD45 和 CD90 的对照为以 PE 标记的抗小鼠 IgG 孵育的细胞样本,CD44 的对照为以 FITC 标记的抗小鼠 IgG 孵育的细胞样本。

2.3 成骨性诱导及药物干预

待 P2 90% 融合后进行成骨性诱导(诱导条件为 0.1 mol/L 的 β -甘油磷酸钠、 10^{-7} mol/L 地塞米松和 50 mg/L 的 ASAP)。诱导同时进行实验分组:LY294002 组(含 5×10^{-5} mol/L LY294002),ICA 组(含 1×10^{-5} mol/L ICA),ICA + LY294002 组(含 1×10^{-5} mol/L ICA 及 5×10^{-5} mol/L LY294002),每组平行做三份,并设对照组(CON)。

2.4 RT-Real Time PCR

药物干预 24 h 后提取 Total RNA,弃培养液,加入 1 ml RNAiso Reagent,裂解液;加入 1/5 体积的氯仿,冰浴 15 min,12000 rpm、4℃ 离心 15 min;收集上清,加入等体积异丙醇,充分混匀,4℃ 静置 30 min 后,12000 rpm、4℃ 离心 10 min;弃上清,加入 1 ml 75% 乙醇,12000 rpm、4℃ 离心 5 min 后弃去乙醇,用适量 RNase-free 水溶解后,测 OD260、OD280 和 OD320 值,计算 RNA 纯度(OD260/OD280)和 RNA 浓度(μ g/ μ L)。调整 RNA 浓度,进行反转录;用 SYBR Premix Ex Taq™ Real-time PCR 试剂盒配制 20 μ L PCR 反应体系,实时荧光定量 PCR 的反应条件为:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 31 s,共进行 40 个循环。反应结束后,根据 Ct 值使用双 Δ Ct 法计算基因的相对表达量。引物序列如表 1 所示,由 TakaRa 公司设计并合成。

2.4 Western-blot 药干预后 24 h 提取总蛋白,并检测蛋白表达量。具体步骤如下:弃去培养基用 4℃ 预冷的 PBS 漂洗,加入 150 μ L 的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0、150 mmol/L NaCl、100 mg/L PMSF、1 mg/L 抑蛋白酶肽、1% 吐温-20、0.5% 去氧胆酸钠、1% SDS)静置 30 min 后,4℃、12000 rpm 离心 30 min,取上清,BCA 总蛋白定量;

表 1 Real Time RT-PCR 所用引物序列

Table 1 The primer sequence of Real-Time RT PCR

Gene	GeneBank No.	Primer sequence		Product length/bp
iNOS	NM_012611. 3	Forward	5' CTCACTGTGGCTGTGGTCACCTA-3'	101
		Reverse	5'-GGGTCTTCGGGCTTCAGGTTA-3'	
eNOS	NM_021838. 2	Forward	5'-GCATACCCGCACTTCTGT-3'	108
		Reverse	5'-GCCTTGGCATCTTCTCCC-3'	
ALP	NM_013059. 1	Forward	5-CACGTTGACTGTGGTTACTGCTGA-3	158
		Reverse	5'-CCTTGTAACCAAGGCCCG TTG-3'	
GAPDH	NM_017008. 3	Forward	5'-TATCGGACGCCTGGTTAC -3'	140
		Reverse	5'-CTGTGCCGTTGAACCTGC -3'	

95℃变性 5 min, 各组取含 20 μg 蛋白质样品, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离后, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 4℃ 孵育 (1: 1 000 稀释) 过夜; 二抗 (1: 5 000 稀释) 37℃ 孵育 2 h; 每进行下一步实验前 PVDF 膜均用 4℃ 预冷的 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; X 光片检测结果, 灰度值使用 Image-Pro Plus 6. 0 软件扫描测定, 重复三次, 并使用统计软件进行统计学分析。

2.5 统计学分析

所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17. 0 软

件进行单因素方差分析。P < 0. 01 代表极显著差异, P < 0. 05 代表显著差异。

3 结果

3.1 大鼠骨髓基质细胞形态观察

培养 72 h 后 rBMSCs 贴壁生长, 呈梭形 (图 1A); 传代培养两次后 rBMSCs 细胞纯度明显提高, 初期以梭形为主 (图 1B); 接触生长后呈三角形或多角形 (图 1C)。

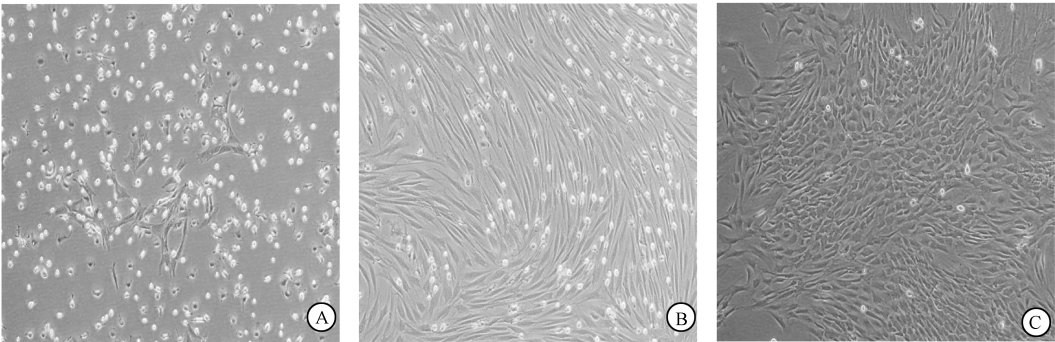


图 1 不同时期骨髓基质细胞形态

A 骨髓基质细胞接种培养 72 h 后贴壁细胞 (×100), 贴壁, 呈梭状或三角形; B 第二代骨髓基质细胞 (×100), 大量克隆以长梭形为主; C 第二代骨髓基质细胞 (×100), 铺满皿底, 密集堆积呈椭圆形

Fig. 1 Morphology of rat marrow stromal cells at different stage

A: Spindle-shaped rBMSCs after 72 h of primary culture 100 × ; B: The rBMSCs at passage 2 100 × ; C: The rBMSCs at passage 2 100 ×

3.2 流式鉴定大鼠骨髓基质细胞

图 2 所示为流式鉴定大鼠骨髓基质细胞结果: 第二代的大鼠骨髓基质细胞表达 CD44 和 CD90 (CD44 与 CD90 均为骨髓基质细胞表面标记物) 大于 95%, 而表达 CD45 (CD45 为造血系细胞表面标记物) 小于 5%, 可以说明培养的细胞大部分是骨髓基质细胞, 达到要求可用于进一步的实验。

3.3 基因表达情况

ICA 组的数据 基因表达水平显著高于 CON 组

(P < 0. 01) (图 3A), LY294002 组与对照组无显著差异, 而 ICA + LY294002 组的表达量显著低于 ICA 组 (P < 0. 01), 且与对照组和 LY294002 组无显著差异, 说明 LY294002 显著抑制 ICA 提高 ALP 基因表达水平的活性, 表明 PI3K/AKT 参与了 ICA 促进骨髓基质细胞成骨分化过程。

图 3B 表明在 ICA 可显著提高 eNOS 在 24 h 的表达 (P < 0. 01), 而当加入阻断剂有效抑制了 AKT 的表达后, eNOS 表达量降低 (P < 0. 01), 提示在短

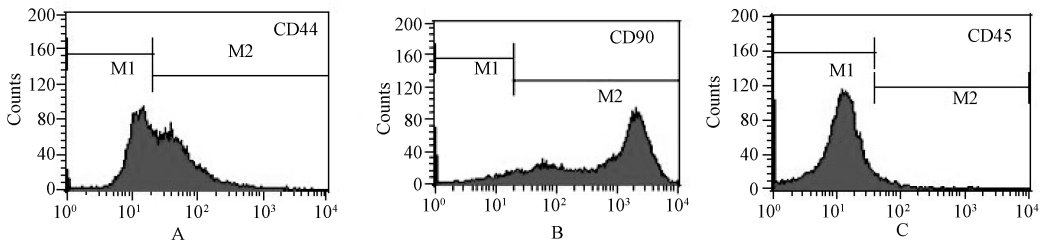


图 2 流式细胞仪鉴定骨髓基质细胞纯度

A CD44 骨髓基质细胞表面标记物,阳性表达大于 95% ;B CD90 骨髓基质细胞表面标记物,阳性表达大于 95% ;
C,CD45 造血系细胞表面标记物,为阴性表达,表达小于 5%

Fig.2 Cell purity identified by flow cytometry

A: CD44-positive cells were more than 95% ; B: CD90-positive cells were more than 95% ;
C: CD45-positive cells were less than 5% .

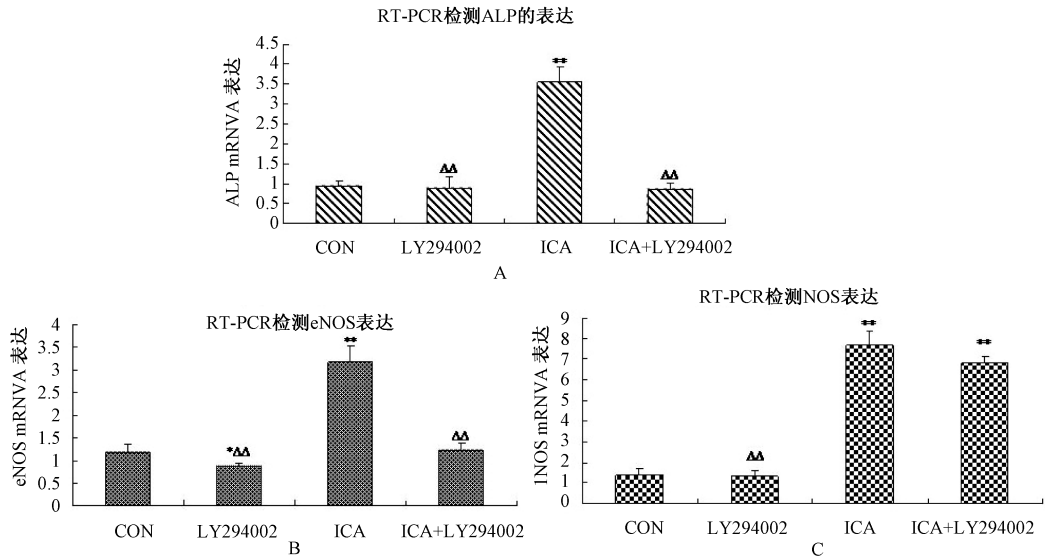


图 3 Real-time RT-PCR 检测骨髓基质细胞相关基因表达基因结果

A;ALP 的基因表达; B: eNOS 的基因表达; C: iNOS 的基因表达
注: ** $P < 0.01$ vs 对照, * $P < 0.05$ vs 对照; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs ICA

Fig.3 The gene expression levels in BMSCs using RT-PCR

A: ALP gene expression; B: eNOS gene expression; C: iNOS gene expression

时间内 eNOS 对 AKT 的影响较为敏感。

图 3C 为 iNOS 的基因表达量,ICA 可以极显著地提高其表达量至对照组的 8 倍左右 ($P < 0.01$),但加入抑制剂后 eNOS 在 24h 时与 ICA 组并没有显著性差异。

3.4 蛋白表达情况

图 4 显示了相关蛋白表达的检测结果:ALP 和 p-AKT 加入 ICA 后蛋白表达升高 ($P < 0.01$),而加抑制剂组及加 ICA 并加抑制剂组蛋白表达均低于 ICA 组,说明 LY294002 起到了对 p-AKT 的特异性阻断作用;eNOS 加 ICA 后蛋白表达也有所提高 ($P < 0.01$),且加抑制剂能使其蛋白表达降低 ($P <$

0.01);而 iNOS 的 ICA 组与 ICA + LY294002 组无明显差别,即在 24 h 时间点时,iNOS 对 LY294002 并不敏感。

4 讨论

淫羊藿苷 (Icariin, ICA) 是淫羊藿中含量最为丰富的黄酮苷类化合物,可以改善心脑血管系统功能、增强机体免疫力及调节内分泌,同时还具有抗肿瘤、抗肝毒、抗缺氧/再灌注等作用^[6]。本课题组报道^[7]淫羊藿苷可明显促进骨髓间充质细胞的成骨性分化,翟远坤^[5]报道了淫羊藿可以通过激活 NO-cGMP-PKG 信号通路以发挥其促进骨形成的作用,

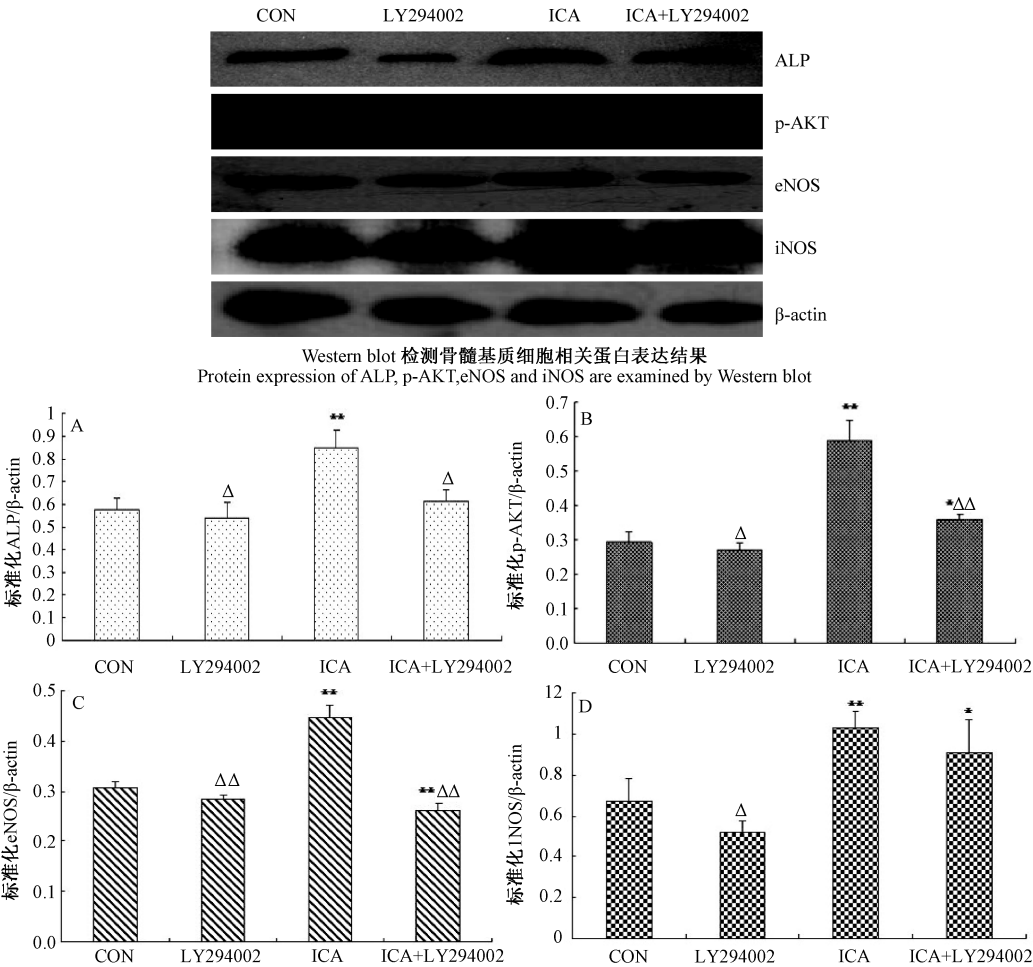


图 4 Western Blot 检测不同药物处理对骨髓基质细胞相关蛋白表达的影响
A:ALP 的基因和蛋白表达结果及 Image-Pro Plus 6.0 分析结果;B:p-AKT 的基因和蛋白表达结果及 Image-Pro Plus 6.0 分析结果;C:eNOS 的基因和蛋白表达结果及 Image-Pro Plus 6.0 分析结果;D:iNOS 的基因和蛋白表达结果及 Image-Pro Plus 6.0 分析结果
注: ** $P < 0.01$ vs 对照, * $P < 0.05$ vs 对照; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs ICA, Δ $P < 0.05$ vs ICA

Fig. 4 The protein expression levels in BMSCs using Western blotting
A: Western blot examination of ALP and the relative optical density of ALP were measured by Image-Pro Plus 6.0; B: Western blot examination of p-AKT and the relative optical density of p-AKT were measured by Image-Pro Plus 6.0; C: Western blot examination of eNOS and the relative optical density of eNOS were measured by Image-Pro Plus 6.0; D: Western blot examination of iNOS and the relative optical density of iNOS were measured by Image-Pro Plus 6.0
** $P < 0.01$ vs CON, * $P < 0.05$ vs CON, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs ICA, Δ $P < 0.05$ vs ICA

但对淫羊藿苷促成骨性分化的一氧化氮通路上游的信号通路未见报道。

AKT是多条信号通路的重要交叉点处于PI3K/AKT通路的中心环节,是PI3K的直接靶基因,参与调节细胞的代谢、增殖、分化和凋亡等一系列生理活动。PI3K/AKT是否与ICA作用于骨髓基质细胞具有相关性值得探讨。本实验发现PI3K/AKT参与了rBMSCs的成骨性分化,具体表现在当加入 1×10^{-5} mol/L(该浓度为本课题组在前期研究中通过系统研究浓度效应而得到的淫羊

藿苷的最佳浓度^[8]。)ICA干预后ALP在基因水平和蛋白水平均显著高于对照组,加入PI3K的特异性抑制剂LY294002后成骨性受到抑制,ALP表达降低。p-AKT的蛋白表达量与ALP变化趋势一致,表明ICA通过PI3K/AKT途径促进了骨髓基质细胞的成骨性分化。

一氧化氮是骨的重要信号分子,在骨的生理病理过程中起着重要作用^[2,9]。NO的生物合成主要由NOS调节其数量和活性,NOS分为不依赖于(下转第906页)

[14]

Löfman O, Hallberg I, Berglund K, et al. Women with low-energy fracture should be investigated for osteoporosis[J]. Acta Orthop,2007,78(6):813-21.

[15]

Zhang Hong, Luo Xianghang, Xie Hui, et al. The correlation of Matrix metalloproteinases -1, -2 with female age, bone turnover markers and bone mineral density. Department of internal medicine, 2006, 45:306-309.

[16]

Heaney RP. Is the paradigm shifting. Bone,2003,33:457-465.

[17]

Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrar B, et al. Biochemical markets of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fracture inpostmenpausal women; the OFELY study. J Bone Minter Res, 2000,15:1526-4536.

[18]

Ross PD, Kress BC, Parson RE, et al. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bonedensity predict fractures; a prospectivestudy. Osteoporos Int,2000,11:76-82.

[19]

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention. Diagnosis and Therapy. JAMA,2001,285:785-795.

[20]

Delmas PD, Eastell R, Garnero P, et al. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Osteoporos Int,2000, Suppl(6):S2-S17.

(收稿日期: 2013-05-08)

(上接第 901 页)

Ca²⁺ 结构型;诱导型(iNOS),另一型为依赖于Ca²⁺/CaM 的结构型,包括内皮细胞型(eNOS)和神经元型(nNOS)^[10]。翟远坤^[5]已报道了ICA 可通过增加NO 生成量而使骨髓基质细胞向成骨性分化。本实验研究表明当加入PI3K 的特异性抑制剂LY294002 后可以有效降低eNOS 的表达,说明PI3K/AKT 与eNOS 是上下游关系,但对于iNOS 并无影响,表明PI3K/AKT 的表达并不影响iNOS 的表达。在加ICA 后24 h 时iNOS 表达显著高于eNOS,起主要作用。此外,对于nNOS 的表达情况本实验尚未涉及,本课题组将于下一步研究中予以关注。

总之,本实验阐明了淫羊藿苷促进rBMSCs 成骨性分化的部分分子机理,为骨质疏松的防治提供了新的思路。

【 参 考 文 献 】

[1]

Besette L, Davison KS, Jean S, et al. The impact of two educational interventions on osteoporosis diagnosis and treatment after fragility fracture; a population-based randomized controlled trial[J]. Osteoporos Int, 2011, 22(12): 2963-72.

[2]

Liu SZ, Yan H, Hou WK, et al. Relationships between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and osteoporosis in postmenopausal women[J]. J Zhejiang Univ Sci

[3]

Chen KM, Ge BF, Liu XY, et al. Icarin inhibits the osteoclast form ationinduced by RANKL and macrophage colony stimulating factor in mouse bone m arrow culture[J]. Pharmazie, 2006, 62(5): 388-91.

[4]

Lv MB, Liu XY, Ge BF, et al. Effects of Icarin on inducing osteoclast formation and bone resorption in mouse bone marrow culture[J]. Chin J Osteopros, 2007, 13(15): 315-49.

[5]

Zhai YK. The study on the molecular mechanism of icariin anti osteoporosis [D]. Master Degree Thesis. Lanzhou University of Technology, 2011:4-20.

[6]

Di KJ, Zhang JB. An Outline of Icarin Pharmacological Study [J]. Chinese Journal of Nature,2003,25(4):191-196.

[7]

Zhai YK, Ge BF, Ma HP, et al. Icarin promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells in vitro[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(23): 3219-22.

[8]

Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Icarin, a flavonoid from the herb Epimedium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells [J]. Die Pharmazie, 2005, 60(12): 939-42.

[9]

Wimalawansa SJ. Nitric oxide: novel therapy for osteoporosis [J]. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9: 3025-44.

[10]

Meng J. The Relationship of NO/ONS and osteoporosis [J]. China Academic Journal Electrnic Publishing House, 2003, 23: 127-29.

(收稿日期: 2013-02-12)

淫羊藿苷促进大鼠骨髓基质细胞成骨性分化过程中对p-AKT及eNOS、iNOS表达量的影响

 万方数据
WANFANG DATA 文献链接

作者：

郭晓宇，葛宝丰，陈克明，甄平，周建，马小妮，GUO Xiaoyu，GE Baofeng，CHEN Keming，ZHEN Ping，ZHOU Jian，MA Xiaoni

作者单位：

兰州军区兰州总医院骨科研究所，甘肃，兰州，730050

刊名：

中国骨质疏松杂志 

英文刊名：

CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS

年，卷(期)：

2013, 19(9)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201309001.aspx