

· 论著 ·

淫羊藿苷对人成骨样细胞成骨分化及 OPG/RANKL 表达的影响

张顺聪^{1,2} 郭丹青¹ 李永贤² 唐永超¹ 杨志东¹ 梁德^{1*} 李大星² 莫国业² 冯蓬勃²

1. 广州中医药大学第一附属医院脊柱骨科, 广州 510405

2. 广州中医药大学, 广州 510400

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 04-0433-05

摘要: **目的** 探讨淫羊藿苷对人成骨样细胞(MG-63)成骨分化及 OPG/RANKL 表达的影响。**方法** 用 1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L 5 种浓度的淫羊藿苷对 MG-63 进行干预, 并同时成骨诱导, RT-PCR 在第 3 天检测其细胞增殖基因 MYC、CDK7 表达量, 在第 6 天检测成骨分化标志基因 RUNX2、COL1A1 及 OPG、RANKL 的表达量。**结果** 对成骨分化相关基因, 10 nmol、1 μmol 干预的 MG-63 RUNX2 基因表达量较 1 nmol 及 10 μmol 的高($P < 0.05$), 与 100 nmol 及空白对照组没有明显差别($P > 0.05$), 10 μmol 的 RUNX2 蛋白表达量较其余各组更高; COL1A1 的基因表达呈剂量依赖型, 随浓度的增加而升高, 10 μmol 的表达量较其余各组有明显升高($P < 0.05$), 其蛋白表达也更多; RANKL 的表达量极低, 且在各组之间均无明显差异($P > 0.05$); OPG 的表达在 1 μmol 浓度时较 100 nmol、10 μmol 明显增高($P < 0.05$), 与 1 nmol、10 nmol 及空白组没有统计学差异($P > 0.05$); 与细胞增殖相关的 MYC 的表达各组之间均没有差异($P > 0.05$), 而 CDK7 的表达均较空白组降低($P < 0.05$)。**结论** 10 μmol/L 的淫羊藿苷能够明显促进 MG-63 细胞的成骨分化, 但并不通过影响 OPG/RANKL 起效。

关键词: 淫羊藿苷; MG-63; 成骨分化; OPG/RANKL

Effects of icariin on the differentiation of osteoblast and regulation of the OPG-RANKL system in MG-63 cells

ZHANG Shuncong^{1,2}, GUO Danqing¹, LI Yongxian², TANG Yongchao¹, YANG Zhidong¹, LIANG De^{1*}, LI Daxing², MO Guoye², FENG Pengbo²

1. Department of Spine Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405

2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510400, China

Corresponding author: LIANG De, Email: lqloveclover@foxmail.com

Abstract: **Objective** To explore the effects of icariin on the differentiation of osteoblast and regulation of the OPG-RANKL system in MG-63 Cells. **Methods** The MG-63 cells were cultured in icariin at 1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L, and induced to osteoblast at the same time. The mRNA and protein expression of RUNX2, COL1A1, OPG, and RANKL at 6th day, and mRNA expression of MYC, CDK7 at 3rd day, was analyzed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and western-blot, respectively. **Results** Compared with the control group, the RUNX2, OPG, RANKL, MYC, expression showed no difference with icariin stimulated ($P > 0.05$), but the CDK7 was reduced significantly ($P < 0.05$). Icariin at 10 μmol produced a higher COL1A1 ($P < 0.05$) which was the marker gene of osteoblast. **Conclusion** Icariin at 10 μmol promoted osteoblast differentiation without affecting OPG-RANKL system.

Key words: Icariin; MG-63; Osteoblast differentiation; OPG-RANKL

目前治疗骨质疏松的药物主要作用为抑制骨吸

收, 但同时也会影响骨形成, 甚至可能导致骨肿瘤^[1]。因此为了减少骨量丢失, 需要一种能够诱导成骨细胞生成的治疗方式。目前临床运用的有甲状旁腺素或新型的代谢药物如钙敏受体拮抗剂、Wnt

基金项目: 广东省科技厅基金项目(2012B031800208); 广东省自然科学基金项目(S2013010015870)

* 通讯作者: 梁德, Email: lqloveclover@foxmail.com

通路抑制剂^[2-3],另外异黄酮是一种有前景的防治骨质疏松药物。淫羊藿苷是一种从中药淫羊藿中分离出的活性黄酮糖苷,临床常将淫羊藿用于治疗肾、关节及肝脏等疾病。实验表明淫羊藿苷可促进大鼠成骨骨髓间充质细胞像向成骨细胞分化,并促进成骨细胞的成熟和矿化和抑制破骨细胞生成^[4]。传递成骨细胞和破骨细胞相互作用的一个重要信号通道为骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)/核因子NF- κ B受体激活因子配体(ReceptorActivator of NF- κ B Ligand, RANKL)/核因子NF- κ B受体激活因子(ReceptorActivator of NF- κ B, RANK),淫羊藿苷对人成骨样细胞(MG-63)成骨分化,以及是否通过作用于OPG/RANKL影响成骨分化尚不明确。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人骨肉瘤成骨样细胞系(购于中国典型培养物保藏中心,CCTCC 编号 GDC074)。

1.2 药物

淫羊藿苷试剂(含量98%,上海纯优生物科技有限公司),用DMEM培养基稀释并分别配制成1 nmol/ml, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L,过滤分装后备用。

1.3 试剂及仪器

无酚红DMEM培养液;0.25%胰酶-EDTA;抗坏血酸,焦碳酸二乙酯(DEPC);TRIzol和胎牛血清(FBS,美国Gibco公司);逆转录试剂盒(日本TAKARA公司);引物(合成于life technology公司);PVDF膜(美国Millipore公司);OPG(Santa Cruz生物工程公司)、RANKL(Cell signaling)、GAPDH抗体(Cell signaling);辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗(Cell signaling)。细胞培养箱(SHELLAB公司);超净台(美国Forma Scientific公司),高速低温离心机(Eppendorf公司5804R);全波长多功能酶标仪(上海公司MK3);凝胶影像分析仪(美国Bio-Rad公司Gel Doc XR+),梯度PCR仪(美国BIO-RAD公司T100);实时荧光定量PCR仪(美国BIO-RAD公司CFX96 Touch);生物显微镜(德国Leica公司DM1000);电子天平(赛多利斯公司BSA-623S-CW);细胞培养瓶和培养板(美国Corning Costar公司);10%FBS的1640培养基(美国gibco公司);成骨诱导分化培养基(广州赛业公司)。

1.4 细胞培养、分组及干预实验

MG-63细胞培养(培养基、传代、冻存和复苏)

按常规方法。MG-63细胞分别接种于6孔塑料培养板,隔两天用PBS液进行细胞换液,细胞即将铺满培养板时进行细胞传代,细胞传第5代时用1 nmol/L,10 nmol/L,100 nmol/L,1 μ mol/L,10 μ mol/L淫羊藿苷各2ml进行干预,阴性对照组加入2 ml培养基,再各加入2 ml成骨诱导剂进行成骨诱导分化。

1.5 RT-PCR检测

干预后3、6天提取细胞RNA进行检测,用TRIZOL法提取细胞总RNA,配制10 μ l的反应体系在梯度PCR仪上进行反转录。PCR法检测第3天MYC、CDK7细胞增殖相关基因的表达,第6天检测RUNX2、COL1A1、OPG、RANKL的表达,同时以GAPDH为内参,引物序列见表1。

表1 引物设计

Table 1 The design of primers

基因	引物序列 (5'~3')
OPG	上游 CACAAATTGCAGTCTTTTGTC 下游 TCTGCGTTACTTTGGTGCCA
RANKL	上游 CAACATATCGTTGGATCACAGCA 下游 GACAGACTCACTTTATGGGAACC
RUNX2	上游 TGGTTACTGTCTATGGCGGTA 下游 TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA
COL1A1	上游 GAGGGCCAAGACGAAGACATC 下游 CAGATCACGTCATCGCACAAAC
MYC	上游 GGCTCCTGGCAAAAGGTCA 下游 CTGCGTAGTTGTGCTGATGT
CDK7	上游 AACTACAGGTCAAGTGCTAGCC 下游 TCCTGCATAAGCACATCTCTGA
GAPDH	上游 AATCCCATCACCATCTTCCA 下游 TGGACTCCACGACGTACTCA

PCR条件:预变性94 $^{\circ}$ C 5 min;变性94 $^{\circ}$ C 45 s,退火60 $^{\circ}$ C 45 s,延伸72 $^{\circ}$ C 1 min,共40个循环,于72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

1.6 蛋白表达检测

干预6天后进行细胞总蛋白提取,采用Western blot检测OPG、RANKL、RUNX2、COL1A1蛋白质表达。

1.7 统计学分析

所有数据采用SPSS 13.0统计学软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组的组间比较用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性, $P > 0.05$ 为差异无显著性。

2 结果

不同浓度淫羊藿苷干预后OPG、RANKL、RUNX2、COL1A1、CDK7、MYC mRNA表达结果见图

1, 蛋白表达量见图 2。对成骨分化相关基因, 10 nmol、1 μ mol 干预的 MG-63 RUNX2 基因表达量较 1 nmol 及 10 μ mol 的高 ($P < 0.05$), 与 100 nmol 及空白对照组没有明显差别 ($P > 0.05$), 10 μ mol 的 RUNX2 加而升高, 10 μ mol 的表达量较其余各组有明显升高 ($P < 0.05$), 其蛋白表达也更多; RANKL 的基因表达量极低, 且在各组之间均无明显差异 ($P > 0.05$), 但 100 nmol 时趋于更多, 10 nmol 时趋于更少, 而 RANKL 的蛋白表达无条带; OPG 的表达在 1 μ mol 浓度时较 100 nmol、10 μ mol 明显增高 ($P < 0.05$), 与 1 nmol、10 nmol 及空白组没有统计学差异 ($P > 0.05$), 但 1 μ mol 浓度时 OPG 表达量有增多趋势; 与细胞增殖相关的 MYC 的表达各组之间均没有差异 ($P > 0.05$), 而 CDK7 的表达均较空白组降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

近几年多项实验已经表明淫羊藿苷在促进细胞成骨分化中具有重要作用^[5-7], Luo 等人^[5]研究发现 10^{-5} mol/L 的淫羊藿苷能恢复体外老年去卵巢大鼠

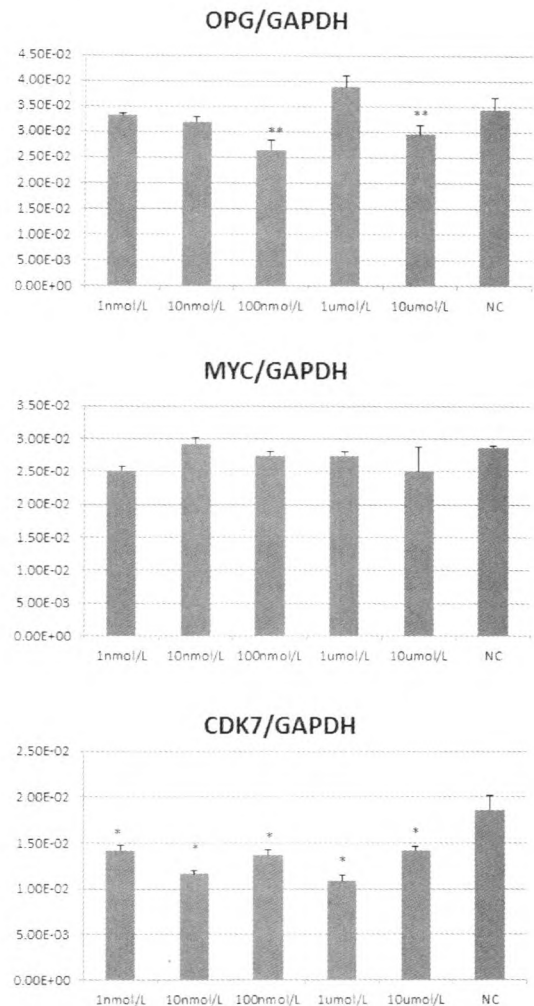
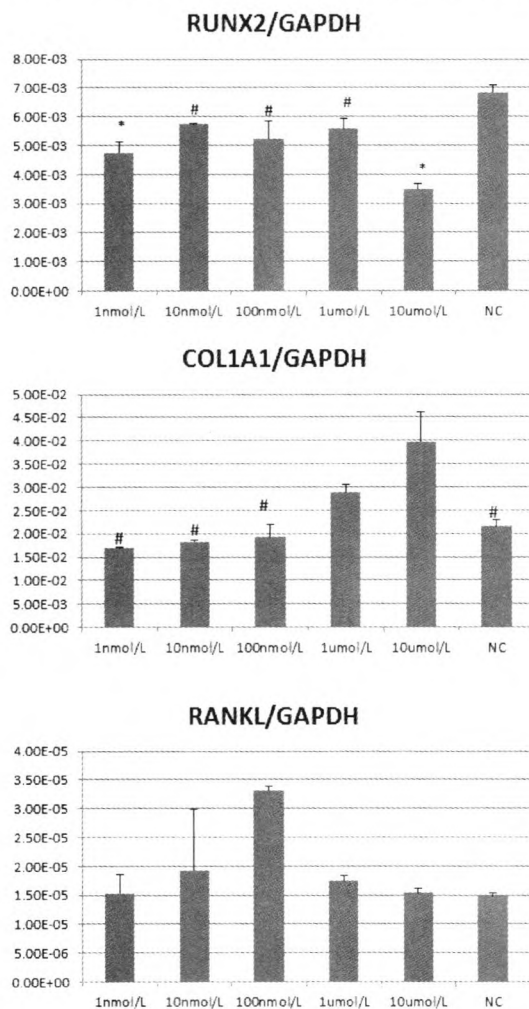


图1 不同浓度淫羊藿苷干预后各基因表达量

注: * 与对照组相比 $P < 0.05$; # 与 10 μ mol/L 组相比 $P < 0.05$; ** 与 1 μ mol/L 组相比 $P < 0.05$

Fig. 1 The mRNA expression of RUNX2, COL1A1, OPG and RANKL in MG-63 cells were determined by real-time PCR after treatment with different concentrations of Icaritin for 6 days, and CDK7 and MYC for 3 days.

* Compared with the control group, $P < 0.05$; # Compared with the treatment at 10 μ mol/L, $P < 0.05$; ** Compared with the treatment at 1 μ mol/L, $P < 0.05$.

因雌激素减少和老龄所致的骨髓间充质干细胞向成骨分化减少的能力, 主要是通过影响雌激素信号通路; Ma 等人^[6]发现 10^{-5} mol/L 的淫羊藿苷比 10^{-8} mol/L 的地塞米松更能明显促进大鼠成骨细胞的碱性磷酸酶活性和钙盐沉积; Song^[7]进行实验发现淫羊藿苷可诱导 MC3T3-E1 细胞 ERK 和 JNK 的生成, 而抑制 MAPK 信号通路可减少淫羊藿的促成骨效应, 同时也抑制 ERK 和 JNK 的表达, 说明其作用可能与 MAPK 信号通路相关。但大多数文献还是以

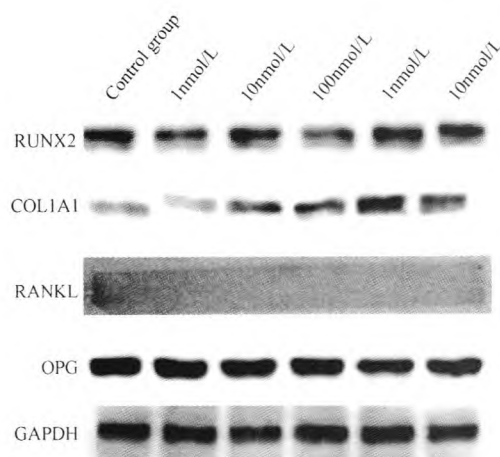


图 2 不同浓度淫羊藿苷干预后各蛋白表达量

Fig. 2 The protein expression of RUNX2, COL1A1, OPG and RANKL in MG-63 cells were determined by western-blot after treatment with different concentrations of Icaritin for 6 days.

动物细胞为研究对象,本研究针对人成骨样细胞 MG-63 受淫羊藿苷影响的表现特点,可能更接近人的成骨分化特征。

RUNX2 和 COL1A1 是成骨分化的两个主要标志基因之一,10 μmol 的淫羊藿苷能促进 COL1A1 基因和蛋白的表达,而 RUNX2 的 mRNA 表达在 10 μmol 最低,而蛋白含量在 10 μmol 最高,这与其它研究动物细胞的结果^[6]不完全一致,这可能是淫羊藿苷作用于 MG-63 细胞的 RUNX2 的转录后调控有关。CDK7 与 MYC 均是细胞增殖中的重要标志基因,尤其是 CDK7,与对照组相比,淫羊藿苷明显抑制 CDK7 的表达,说明淫羊藿苷减少 MG-63 的细胞增殖,促进其进入细胞分化阶段,Song 等^[7]研究也表明淫羊藿苷能降低 MC3T3-E1 细胞 CDK4 的表达而促进细胞分化。

OPG/RANKL/RANK 系统在成骨与破骨细胞的相互平衡中起重要作用,OPG 与 RANKL 能竞争性的结合 RANK 受体,而减少破骨细胞的生成。OPG、RANKL 都是由成骨细胞分泌的^[8],本实验以 MG-63 为研究对象,因其是体外研究成骨细胞功能具有代表性的细胞系。实验发现,MG-63 中 RANKL 的 RNA 和蛋白表达量都极低,甚至包括在空白组,Gori 等^[8]认为在成骨分化过程中,RANKL 的表达量会下降约 5 倍,而 OPG 的表达会上升 7 倍,RANKL 表达量受明显抑制可能是原因之一;另外,Mori 等^[9]研究发现 RANKL 在 MG-63、U2OS、HOB、SAOS-2、HOS 等所有人成骨肉瘤中的表达量都极低,而 Mogi

等^[10]发现 OPG-RANKL 复合体只在 U2OS 细胞中检测得到,在 MG-63、HOB、SAOS-2、HOS 细胞中都无法检测,这也可能是 RANKL 蛋白无法检测出的另一原因,但也有文献报道^[11-12] MG-63 可检测出表达量较高的 RANKL,这些差异可能与细胞在体外培养的具有异质性,某些特性改变有关。虽然结果显示 RANKL 的 mRNA 表达量低,但淫羊藿苷浓度 10nmol 时其表达趋于更受抑制,Wang 等^[12]报道另一种异黄酮类葛根素 1 μmol 能明显抑制 MG-63 中 RANKL 的表达,同时淫羊藿苷能降低 SW1353 人软骨肉瘤细胞中 RANKL 的表达量^[13]。

OPG/RANKL 的比例增高可抑制破骨分化,Wang 等^[14]实验结果表明 MG-63 细胞中 OPG 的表达是受雌激素受体 α (Estrogen receptor α , ER α) 调节的,Luo 等^[5]研究发现淫羊藿苷可上调 MG-63 中 ER α ,但并没有文献报道淫羊藿苷对 OPG/RANKL 表达的直接影响,本实验中不同浓度的淫羊藿苷干预后的 OPG、RANKL 表达量与对照组相比均无明显差异,这说明很可能淫羊藿苷不通过上调 OPG/RANKL 来促进成骨分化,本实验未来将进一步研究其作用机制。

因此,本实验研究发现 10 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿苷可明显促进 COL1A1 的表达量,从而促进成骨细胞的生成,但并不通过作用于 OPG/RANKL 系统起效。

【参 考 文 献】

- [1] H. Bone. Future directions in osteoporosis therapeutics. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2012, 41(3): 655-661.
- [2] M. Zaidi, H. C. Blair, J. Iqbal. Proresorptive actions of FSH and bone loss. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1116: 376-382.
- [3] T. D. Rachner, S. Khosla, L. C. Hofbauer. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [4] H. P. Ma, L. G. Ming, B. F. Ge. Icaritin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 916-923.
- [5] Z. Luo, M. Liu, L. Sun. Icaritin recovers the osteogenic differentiation and bone formation of bone marrow stromal cells from a rat model of estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 382-388.
- [6] X. N. Ma, J. Zhou, B. F. Ge. Icaritin induces osteoblast differentiation and mineralization without dexamethasone in vitro. *Planta Med*, 2013, 79(16): 1501-1508.
- [7] L. Song, J. Zhao, X. Zhang. Icaritin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1-3): 15-22.

(下转第 457 页)

活等非遗传因素方式,对维系较高峰值骨密度水平,延缓骨量丢失速度,从而对中老年时期骨密度产生正向影响。

【参 考 文 献】

- [1] The NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. South Med J, 2001, 94(6): 569-573.
- [2] 赵圆,邢艳,马华,等. VDR 基因 SNPs 多态性与新疆维、汉民族育龄女性腰椎峰值骨密度的关系. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9): 1066-1070.
Zhao Y, Xin Y, Ma H, et al. Relationship between SNPs polymorphism of Vitamin D receptor gene and peak bone mass at lumbar vertebra in the Uygurs and Hans in Xinjiang women. Chinese Journal of Osteoporosis, 2014, 20(9): 1066-1070. (in Chinese)
- [3] 马华,赵圆,刘文亚. 雌激素受体 α 基因多态性与新疆维、汉两民族妇女腰椎峰值骨密度的关系. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(6): 350-353.
Ma H, Zhao Y, Liu WY. Relationship between polymorphism of estrogen receptor- α gene and peak bone mineral density at lumbar vertebra in the Uygurs and Hans in Xinjiang women. Chinese Journal of Osteoporosis, 2012, 18(6): 350-353. (in Chinese)
- [4] 赵圆,代永亮,马华,等. 定量 CT 结合回归模型分析新疆地区维吾尔族与汉族成年女性腰椎骨密度. 中国医学影像学杂志, 2014, 22(8): 613-616.
Zhao Y, Dai YL, Ma H, et al. Quantitative CT Study combined with regression model to analyze bone mineral density of lumbar vertebra in Uygur and Han adult females in Xinjiang. Chinese Journal of Medical Imaging, 2014, 22(8): 613-616. (in Chinese)
- [5] Nilsson M, Ohlsson C, Odén A, et al. Increased physical activity is associated with enhanced development of peak bone mass in men: a five-year longitudinal study. J Bone Miner Res, 2012, 27(5): 1206-1214.
- [6] 中国骨质疏松预防委员会. 中国骨质疏松白皮书. 中华健康管理学杂志, 2009, 3(3): 148-154.
China Osteoporosis Prevention Committee. Osteoporosis China white paper. Chin J Health Manage, 2009, 3(3): 148-154. (in Chinese)
- [7] Du X, Zhu K, Trube A, et al. School-milk intervention trial enhances growth and bone mineral accretion in Chinese girls aged 10-12 years in Beijing. Br J Nutr, 2004, 92(1): 159-168.
- [8] Bonjour JP, Chevalley T, Ammann P, et al. Gain in bone mineral mass in prepubertal girls 3. 5 years after discontinuation of calcium supplementation: a follow-up study. Lancet, 2001, 358(9289): 1208-1212.
- [9] Prynn CJ, Mishra GD, O'Connell MA, et al. Fruit and vegetable intakes and bone mineral status: a cross-sectional study in 5 age and sex cohorts. Am J Clin Nutr, 2006, 83(6): 1420-1428.
- [10] Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(1): 275-279.

(收稿日期: 2015-08-01)

(上接第 436 页)

- [8] F. Gori, LC. Hofbauer, CR. Dunstan. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. Endocrinology, 2000, 141(12): 4768-4776.
- [9] K. Mori, B. Le Goff, M. Berreur. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. J Pathol, 2007, 211(5): 555-562.
- [10] M. Mogi, A. Kondo. The presence of RANKL-OPG complex in human osteosarcoma U2OS. J Immunoassay Immunochem, 2013, 34(4): 356-364.
- [11] Y. Ren, SY. Han, PP. Li. Effects of anastrozole combined with Shuganjiang decoction on osteoblast-like cell proliferation, differentiation and OPG/RANKL mRNA expression. Chin J Cancer Res, 2012, 24(2): 151-156.
- [12] Y. Wang, C. Yang, WL. Xie. Puerarin concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and interleukin-6 production in human osteoblastic MG-63 cells. Phytomedicine, 2014, 21(8-9): 1032-1036.
- [13] Z. Wang, L. Ding, S. Zhang. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1beta-stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells. Int J Mol Med, 2014, 34(6): 1720-1726.
- [14] Y. Wang, LZ. Li, YL. Zhang. LC, a novel estrone-rhein hybrid compound, concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and interleukin-6 production by human osteoblastic cells. Mol Cell Endocrinol, 2011, 337(1-2): 43-51.

(收稿日期: 2015-08-29)