

· 论 著 ·

红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的影响

余 倩¹ 宋双红^{1,2} 李翠芹^{1*}

1. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室/药用资源与天然药物化学教育部重点实验室/陕西师范大学生命科学学院, 陕西西安 710119

2. 西北工业大学生命学院特殊环境生物物理学研究所, 空间生物实验模拟技术重点实验室, 陕西 西安 710072

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 05-0528-05

摘要: 目的 研究红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 成骨样细胞增殖、分化和矿化的影响。方法 大鼠灌胃红车轴草总异黄酮一定时间后, 制备含药血清, 并分别采用 MTT 法、碱性磷酸酶活性测定法、ELISA 法和茜素红染色测定矿化结节的方法考察不同浓度红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖率、碱性磷酸酶活性、骨钙素生成以及矿化结节形成的影响。结果 不同浓度的红车轴草总异黄酮含药血清都能显著促进 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖并显著提高 MC3T3-E1 成骨样细胞碱性磷酸酶的活性, 且最佳的含药血清浓度为 5%; 5% 的红车轴草总异黄酮含药血清处理 MC3T3-E1 成骨样细胞 6 d 和 9 d 可显著促进骨钙素的分泌; 5% 的红车轴草总异黄酮含药血清处理 MC3T3-E1 成骨样细胞 6 d、12 d 和 18 d, 形成的矿化结节均显著高于对照组。结论 红车轴草总异黄酮含药血清可以显著促进 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖、碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌和矿化, 说明红车轴草总异黄酮含药血清确实可以促进 MC3T3-E1 成骨样细胞的分化成熟, 该药物具有开发为抗骨质疏松症新药的潜力。

关键词: 红车轴草; 含药血清; 成骨样细胞; 增殖; 分化; 矿化

Effect of *trifolium pretense*-derived total isoflavones containing serum on the proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3-E1 cellYU Qian¹, SONG Shuanghong^{1,2}, LI Cuiqin^{1*}

1. National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry of the Ministry of Education, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119

2. Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

Corresponding author: LI Cuiqin, Email: licuiqin16@snnu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the effect of *trifolium pretense*-derived total isoflavones containing serum on the proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3-E1 osteoblastic cells *in vitro*. **Methods** Rats were intragastrically administered with the *t. pretense*-derived total isoflavones to prepare drug containing serum. The proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells was determined using MTT method. The activity of alkaline phosphatase and osteocalcin were determined using ELISA. The mineralized nodules were observed using Alizarin red staining method. **Results** Different concentrations of total isoflavones containing serum significantly promoted the proliferation and increased the activity of alkaline phosphatase of MC3T3-E1 osteoblastic cells. The best concentration of the serum was 5%. 5% of total isoflavones containing serum significantly promoted the secretion of osteocalcin in MC3T3-E1 osteoblastic cells at 6th day and 9th day, and promoted the formation of mineralized nodules in MC3T3-E1 osteoblastic cells at 6th day, 12th, and 18th day. **Conclusion** The *t. pratense*-derived total isoflavones containing serum significantly promotes the proliferation, the activity of alkaline phosphatase, the secretion of osteocalcin, and the mineralization of

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(GK201303009); 陕西省自然科学基金基础研究项目(2014JQ3100)

* 通讯作者: 李翠芹, Email: licuiqin16@snnu.edu.cn

MC3T3-E1 osteoblastic cells, indicating that it can significantly promote the maturation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. The total isoflavones has the potential to develop a new medicine for osteoporosis.

Key words: *Trifolium pratense* L.; Drug containing serum; MC3T3-E1 cells; Proliferation; Differentiation; Mineralization.

红车轴草 (*Trifolium pratense* L.) 是一种多年生草本植物, 属于豆科车轴草属, 又名红三叶草, 其花序和花枝含有大量异黄酮成分, 因其具有雌激素样作用而备受关注^[1]。研究表明红车轴草总异黄酮具有改善妇女更年期症状和防治骨质疏松的作用^[1-3]。本研究采用血清药理学和体外培养 MC3T3-E1 成骨样细胞的方法观察含红车轴草总异黄酮的大鼠血清对 MC3T3-E1 成骨样细胞增殖、分化及矿化的影响, 从细胞学水平探讨红车轴草总异黄酮促进骨形成的作用机制, 为红车轴草总异黄酮治疗骨质疏松症的研究提供一定的资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞系:健康 SD 雌性大鼠 32 只, 体重 200 ± 20 g, 购自第四军医大学 SPF 动物实验中心, 动物合格证号陕医动字 08-014 号。饲养条件: 室温 24 ± 2 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 每日人工照明和黑暗处理各 12 h, 自由饮水, 喂食颗粒饲料。MC3T3-E1 成骨样细胞系 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.1.2 药物和试剂:红车轴草总异黄酮 (陕西慈缘生物技术有限公司, 含量 $\geq 98.0\%$, 批号为 CY140415); α -MEM 培养基和胎牛血清 (FBS) (Gibco 公司); 维生素 C、 β -甘油磷酸钠、噻唑兰 (MTT) 和胰蛋白酶 (Sigma 公司); 碱性磷酸酶试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 骨钙素 (OC) 测试盒 (北京科盈美科技有限公司); 茜素红 (天津化学试剂厂); 链霉素、青霉素 (华北制药厂); 二甲亚砜 (DMSO) (MP Biomedicals 公司), 其余试剂均为分析纯级。

1.1.3 仪器:恒温 CO₂ 培养箱 (新加坡艺思高科技有限公司), Infinite M200 型多功能酶标仪 (奥地利 Tecan 公司), 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), YJ-875 型超净工作台 (苏州净化设备厂), 离心机 (江苏牡丹离心机制造有限公司), 超低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 含药血清的制备:32 只雌性 SD 大鼠, 随机分成 2 组, 一组为服药组, 按 100 mg/kg 灌服红车轴草总异黄酮, 每天 1 次, 连续 7 d。另一组为对照组,

只灌服相同体积的生理盐水。第 7 d 灌胃 1.5 h 后, 所有大鼠均在乙醚麻醉下自腹主动脉抽取血液, 同组合并后于 4°C 静置 30 min, 以 $2000 \times g$, 4°C 离心 20 min 获取红车轴草总异黄酮含药血清或对照血清 (生理盐水含药血清)。血清在 56°C 灭活 30 min, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后, -80°C 保存备用, 使用时注意避免反复冻融。

1.2.2 细胞培养:MC3T3-E1 细胞复苏后接种于细胞培养瓶中, 以含 10% FBS、1% 配制好的双抗的 α -MEM 培养基培养, 2 d 换液 1 次, 待细胞铺满 80% 瓶底后胰蛋白酶消化传代, 继续培养, 待细胞再次铺满 80% 瓶底后胰蛋白酶消化, 以不同的密度接种于 96 孔板或者 24 孔板进行实验。

1.2.3 细胞增殖测定:培养中的细胞铺满 80% ~ 90% 瓶底后胰蛋白酶消化传代, 以 2×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔总体积 200 μ L。24 h 后加入含不同浓度红车轴草总异黄酮含药血清的培养液, 终浓度分别为 2.5%、5% 和 10%, 对照组加入含大鼠空白血清的培养液, 终浓度分别为 2.5%、5% 和 10%, 调零组不含细胞和药物, 每组设置 6 个平行孔。24 h、48 h、72 h 和 96 h 后向培养液中加入 20 μ L 的 MTT, 继续培养 4 h。弃培养液, 每孔加入 100 μ L 的 DMSO, 振荡 10 min 以保证甲瓚全部溶解, 酶标仪 570 nm 处测定光密度 $D(\lambda)$ 值, 计算细胞增殖率。

1.2.4 碱性磷酸酶活性测定:培养中的细胞铺满 80% ~ 90% 瓶底后胰蛋白酶消化传代, 以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔总体积 200 μ L。待细胞铺满孔底后更换为含有维生素 C 和 β -甘油磷酸钠的诱导性培养基, 实验组加入不同浓度的红车轴草总异黄酮含药血清, 终浓度分别为 2.5%、5% 和 10%, 对照组加入含大鼠空白血清的培养液, 终浓度分别为 2.5%、5% 和 10%, 调零组不含细胞和药物, 每组设置 6 个平行孔。每 2 d 换对应的诱导性培养液, 在第 3 d 和第 6 d 按照试剂盒说明书测定碱性磷酸酶的活性。

1.2.5 骨钙素含量的测定:培养中的细胞铺满 80% ~ 90% 瓶底后胰蛋白酶消化传代, 以 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中, 每孔总体积 1 mL。待细胞铺满孔底后更换为含有维生素 C 和 β -甘油磷

酸钠的诱导性培养基,实验组加入 5% 红车轴草总异黄酮含药血清,对照组加入 5% 空白大鼠血清,调零组不含细胞和药物,每组设置 3 个平行孔。细胞诱导性培养后每 3 d 换 1 次培养液,每次换液保留 1 mL 旧培养液,于 -20°C 保存,连续收集第 3 d、6 d、9 d、12 d 的样品,采用 ELISA 法检测骨钙素的分泌量,以 mg/L 培养液表示。

1.2.6 细胞矿化结节量测定:培养中的细胞铺满 80%~90% 瓶底后胰蛋白酶消化传代,以 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中,每孔总体积 1 mL。待细胞铺满孔底后更换为含有维生素 C 和 β -甘油磷酸钠的诱导性培养基,实验组加入 5% 红车轴草总异黄酮含药血清,对照组加入 5% 空白大鼠血清,调零组不含细胞和药物,每组设置 3 个平行孔。每 2 d 换对应的诱导性培养液,在第 6 d、12 d、18 d 弃去培养液,PBS 清洗 3 次后用 70% 的乙醇固定 1 h,蒸馏水清洗 3 次,加入提前配制的 40 mmol/L 茜素红染液 ($\text{pH}=4.2$) 于 37°C 孵育 10 min,再用蒸馏水清洗 3 次,用 PBS 于 37°C 孵育 10 min,镜下观察矿化结节并量化。

1.2.7 统计学处理:实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理软件为 Graphpad prism 5.01,组间比较采用 t 检验,mann-whitney U test 分析。

2 结果

2.1 红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

MTT 实验结果(图 1)表明:红车轴草总异黄酮含药血清各浓度组与对照组相比,作用于细胞 48 h、72 h 和 96 h,均可显著提高 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖率。

2.2 红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 细胞分化的影响

碱性磷酸酶(ALP)活性测定实验结果(图 2)表明:与对照组相比,5% 红车轴草总异黄酮含药血清作用于 MC3T3-E1 细胞 3 d、6 d、9 d 和 12 d,均能显著提高其碱性磷酸酶的活性。

2.3 红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 细胞骨钙素分泌的影响

ELISA 法检测骨钙素的分泌量(图 3)表明:5% 的红车轴草总异黄酮含药血清处理 MC3T3-E1 细胞 6 d 和 9 d 骨钙素分泌量显著高于对照组。

2.4 红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 细胞矿化的影响

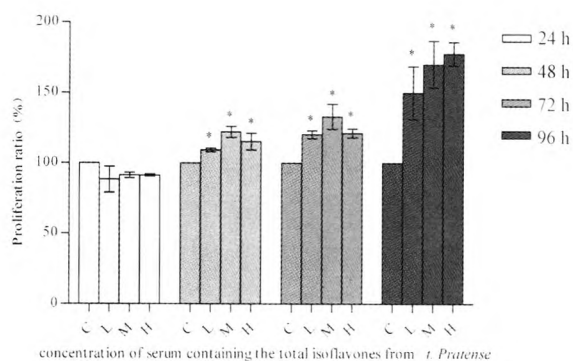


图 1 细胞增殖率检测,与空白组比较 (* $P < 0.05$ vs control.)

C: 对照组; L: 低浓度组(2.5%); M: 中浓度组(5%); H: 高浓度组(10%);

Fig. 1 Cell proliferation rate detection. compared with the control

C: control; L: low concentration group (2.5%); M: middle concentration group (5%); H: high concentration group (10%).

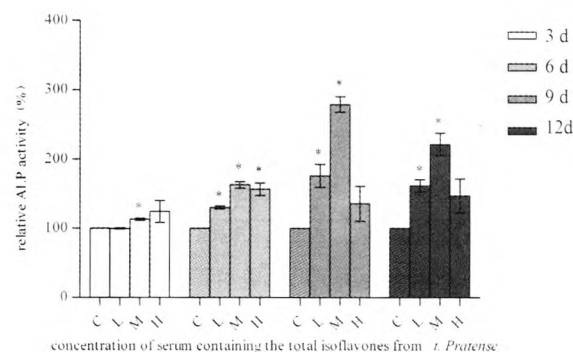


图 2 相对 ALP 活性检测,与空白组比较 (* $P < 0.05$ vs control.)

C: 对照组; L: 低浓度组(2.5%); M: 中浓度组(5%); H: 高浓度组(10%);

Fig. 2 Detection of relative ALP activity. Compared with the control, (* $p < 0.05$ vs control.)

C: control; L: low concentration group (2.5%); M: middle concentration group (5%); H: high concentration group (10%)

茜素红染色法测定结果(图 4)表明:5% 红车轴草总异黄酮含药血清处理细胞 6 d、12 d 和 18 d,形成的矿化结节数均显著高于对照组。

3 讨论

骨重建是健康骨组织中的一个重要生理过程,其主要包括成骨细胞的骨生成过程和破骨细胞的骨吸收过程,若骨吸收过程大于骨生成,则就会形成骨

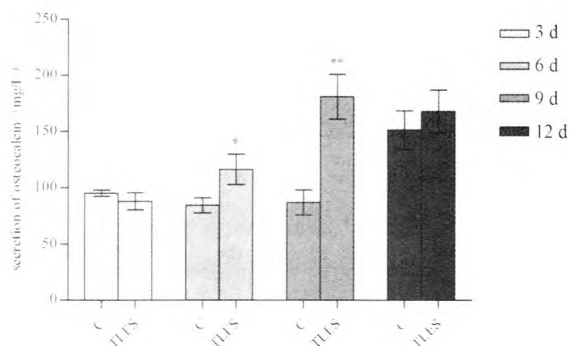


图3 骨钙素分泌检测,与空白组比较(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.)

C:大鼠空白血清对照组;TLES:红车轴草总异黄酮含药血清组

Fig. 3 Detection of osteocalcin level. Compared with the control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

C: blank rat serum control group; TLES: serum containing the total isoflavones from t. Pratense group

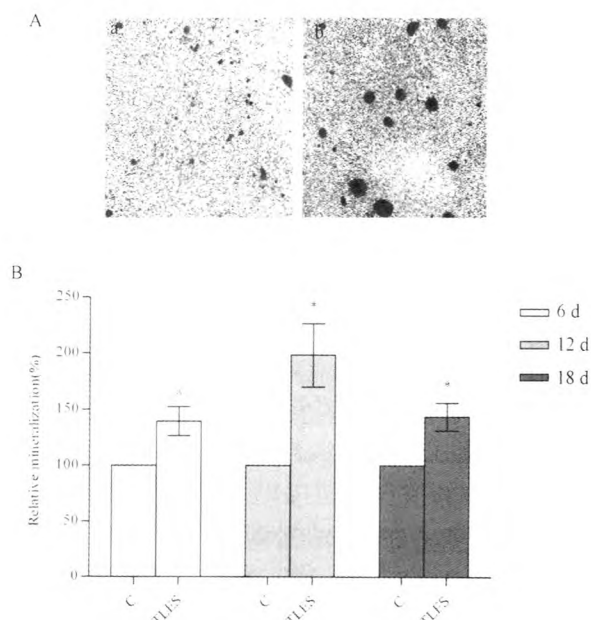


图4 A:第18 d显微镜下观察的矿化结节(a:对照组4×;b:红车轴草总异黄酮含药血清组4×);B:矿化结节面积的量化分析(* $P < 0.05$ vs control.) C:大鼠空白血清对照组;TLES:红车轴草总异黄酮含药血清组

Fig. 4 Detection of relative mineralization.

A: Images of mineralized nodules observed in microscope on D18. (a: control, 4×; b: serum, 4×). B: Quantitative analysis of the area of mineralization, * $p < 0.05$ vs control. C: Blank rat serum group; TLES: serum containing the total isoflavones from t. Pratense group.

质疏松症等疾病^[4],骨质疏松症是全球四大非传染性致死疾病之一,直接导致患病人群的生活质量下

降和一定的经济负担^[5]。因此,筛选抗骨质疏松症药物并在细胞学水平进行药效评价是非常必要的。

机体是一个复杂的系统,骨代谢受多种因素的影响,药物在体内代谢可产生许多药理活性产物,出现许多药理作用。红车轴草总异黄酮主要包括大豆苷元(daidzein)、染料木素(genistein)、鹰嘴豆芽素A(biochanin A)和鹰嘴豆芽素B(biochanin B)等。异黄酮类成分在肝脏与葡萄糖醛酸、硫酸结合后部分以原形排出体外。先前研究提示大豆苷元仅口服剂量的7%–30%从尿中排出和小于10%从粪便排出^[6-7],表明大豆苷元在体内进行广泛代谢,除部分转化牛尿酚(equol)和O-去甲基安哥拉紫檀素(O-desmethylangolensin)外,大豆苷元在肝微粒体中可发生羟化代谢,其中单羟基化代谢物为其主要代谢物^[8-9]。另外,细菌也氧化部分异黄酮。因此,通过中药血清药理学的方法进行研究有着更重要的意义。

成骨细胞起源于多能的骨髓基质的间质细胞,在骨形成过程中经历分裂增殖、分化成熟和基质钙化3个阶段。MC3T3-E1细胞是从C57BL/6小鼠颅顶骨细胞中建立的成骨细胞株,国际上常作为骨代谢研究的细胞模型,在细胞水平上阐明药物防治骨质疏松症的作用机制。本实验应用红车轴草总异黄酮含药血清在细胞水平上以MC3T3-E1成骨细胞的增殖、碱性磷酸酶活性、骨钙素生成以及矿化结节形成作为指标,观察其对体外培养的MC3T3-E1成骨样细胞的影响。结果显示:不同浓度的红车轴草总异黄酮含药血清作用于细胞48 h、72 h和96 h,均可显著提高MC3T3-E1成骨样细胞的增殖率($P < 0.05$),并具有一定的时效关系,说明其具有促进MC3T3-E1成骨样细胞增殖的作用。

碱性磷酸酶和骨钙素分别是成骨样细胞早期和晚期分化的标志,是最常见评价骨形成的指标,与对照组相比,红车轴草总异黄酮含药血清各浓度组在作用6 d、9 d和12 d均能显著提高碱性磷酸酶的活性($P < 0.05$);而且,5%红车轴草总异黄酮含药血清可显著性促进成骨样细胞的骨钙素分泌,提示其能促进成骨细胞分化。

骨基质的矿化对于骨量的增加是至关重要的。它不仅是成骨细胞的重要生物学特征,也是考察药物对成骨细胞促成骨作用的最有效方式。5%红车轴草总异黄酮含药血清处理细胞6 d、12 d和18 d形成矿化结节数都显著高于对照组,提示其能促进成骨细胞矿化。

(下转第539页)

列代谢紊乱的基础。通过干预 OSAHS 患者低氧状态和炎症反应,对 OSAHS 患者骨质疏松症的预防和治疗具有指导作用。

【参 考 文 献】

- [1] Yamauchi M, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea: putative pathways to the cardiovascular complications[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(4): 755-768.
- [2] Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, et al. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnea-hypopnea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study[J]. *Lancet*, 2005, 365: 1046-1053.
- [3] Arnett TB. hypoxia and bone[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 503: 103-109.
- [4] Li LF, Liu WY, Yang TT, et al. Reductive glutathione on intermittent hypoxia rat hypothalamus-Intervention ultrastructure and function of the adrenal axis-pituitary. *Chinese Journal of tuberculosis and respiratory*, 2015, 2: 138 - 140.
- [5] Sánchez M, Campos-Bodriguez F, Barbé Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease[J]. *Lancet Respir Med*, 2013(1): 61-72.
- [6] Jin CE, Wu D, He ZQ, et al. Analysis of the relationship between obstructive sleep apnea-hypopnea and osteoporosis. *chinese Journal of Osteoporosis*, 2015, 1(29): 63-66.
- [7] Utting JC, Robins SP, Brandao-Burch A, et al. Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts [J]. *Experimental Cell Res*, 2006, 312(10): 1693-1702.
- [8] Kulak CA, Borba VC, Jorgetti V, et al. Skeletal microstructural abnormalities in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. *J Bone Res*, 2010, 25(9): 1931-1940.
- [9] Htomiya R, Okazaki D, Inoue H, et al. Link between obstructive sleep apnea and increased bone resorption in men [J]. *Osteoporos Int*, 2008, 19: 1185-1192.
- [10] Atkeson A, Yeh SY, Malhotra A, et al. Endothelial function in obstructive sleep apnea[J]. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009, 51(5): 351-362.
- [11] Alberti A, Sarchielli P, Gallinella E, et al. plasma cytokine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study[J]. *J Sleep Res*. 2003, 12(4): 305-11.
- [12] Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, et al. Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects[J]. *J Appl physiol* (1985). 2010, 108(1): 68-75.

(收稿日期: 2015-11-23)

(上接第 531 页)

本实验从红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖、碱性磷酸酶活性、骨钙素以及矿化等四方面进行了研究,结果显示红车轴草总异黄酮含药血清不仅可以增加 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖率,提升碱性磷酸酶的活性,还可以促进 MC3T3-E1 成骨样细胞的骨钙素分泌,进而提高成骨样细胞的矿化水平。

综上所述,本实验在细胞水平观察了红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 成骨样细胞代谢调控的影响,发现其具有促进 MC3T3-E1 成骨样细胞增殖、促进细胞分化成熟、以及促进细胞矿化的作用,从而为红车轴草总异黄酮应用于临床治疗骨质疏松症提供了理论和实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] Long Y, Zheng YC. Research progress of red clover. *China Medical Herald*, 2009, 6(13): 10-11. (in Chinese).
- [2] Yang LZ. Effect of red clover isoflavones on menopausal female rats B-endorphin neuron. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2007, 35(4): 28-30. (in Chinese).
- [3] Li Y, Xue CK, He XB, et al. Investigation of red clover isoflavones on prevention and treatment in rat without ovarian. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2005, 11(4): 509-511. (in Chinese).
- [4] Ren HF, Ren HY, Li X, et al. Effects of intermedin on proliferation, apoptosis and the expression of OPG/RANKL/MCSF in the MC3T3E1 osteoblast cell line. *Mol Med Report*, 2015, in press, DOI: 10.3892/mm. 2015. 4328.
- [5] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [6] King RA, Bursill DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavone daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67: 867-872.
- [7] Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr*, 1998, 128: 1710-1715.
- [8] Kulling SE, Honig DM, Simat TJ. Oxidative *in vitro* metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 4963-4972.
- [9] Kulling SE, Honig DM, Manfred M. Oxidative metabolism of the soy isoflavone daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem*, 2001; 49: 3024-3033.

(收稿日期: 2015-10-19)