

· 论著 ·

补肾健脾中药复方干预成骨细胞内细胞凋亡蛋白的机制研究

李颖^{1*} 黄宏兴² 姜志强¹

1. 广东省中西医结合医院, 佛山 528200

2. 广州中医药大学, 广州 510405

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016)11-1391-04

摘要: 目的 分析补肾健脾中药复方对成骨细胞内 Bcl-2、Bax 和 Bid 的调控作用, 探讨细胞凋亡信号途径和骨质疏松症的相关关系。方法 选用 1 日龄 SD 大鼠获取原代的成骨细胞体外培养, 细胞分成治疗组、对照组和正常组, 治疗组给予补肾健脾中药复方含药血浆, 对照组给予戊酸雌二醇含药血浆培养, 正常组常规培养, 采用 MTT 比色法记录各组细胞的 OD 值, 荧光定量 PCR 法检测各组 Bcl-2、Bax 和 Bid 表达。结果 在细胞增殖方面, 治疗组的 OD 值在第 8 天时达最大值, 明显高于对照组 ($P < 0.05$), 从而确定第 8 天为最佳实验时间; 与对照组相比, 治疗组中 Bcl-2、Bax 和 Bid 蛋白的表达量上升, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而且治疗组的 Bcl-2/Bax 比值明显高于对照组, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 补肾健脾中药复方能下调 Bcl-2、Bax 和 Bid 的表达, 在一定程度上抑制成骨细胞的凋亡。

关键词: 中医中药; 成骨细胞; 补肾健脾; 凋亡蛋白; 机理研究

Study of the mechanism of Chinese herbal compound of tonifying kidney and strengthening spleen to interfere the apoptotic proteins in osteoblasts

LI Ying^{1*}, HUANG Hongxing², JIANG Zhiqiang¹

1. Guangdong Province Integrative Medicine Hospital, Foshan 528200, Guangdong

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

Corresponding author: LI Ying, Email: nhqzyy@163.com

Abstract: Objective To analyze the intervention effect of Chinese herbal compound of tonifying kidney and strengthening spleen on Bcl-2, Bax, and Bid in osteoblasts, and to explore the relationship between the apoptosis signal pathway and osteoporosis.

Methods Osteoblasts were harvested from 1-day-old SD and cultured. Cells were divided into observation group, control group, and normal group. Cells in observation group were cultured with medium of drug containing plasma of Chinese herbal compound. Cells in control group were cultured with medium of drug containing plasma of estradiol valerate. Cells in normal group were given routine culture. Cell OD value in each group was recorded using MTT assay. Expression of Bcl-2, Bax, and Bid protein in each group was detected with fluorescence quantitative PCR. **Results** In cell proliferation, the OD value in observation group reached the maximum in 8 days, which was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). So it was determined that the 8th day was the best time for the experiment. The expression of Bcl-2, Bax, and Bid protein in observation group increased significantly in observation group compared to that in control group, and the difference was significant ($P < 0.05$). Bcl-2/Bax ratio in observation group was higher than that in control group, and the difference reached statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Chinese herbal compound of tonifying kidney and strengthening spleen down regulates the expression of Bcl-2, Bax, and Bid protein, and inhibits the apoptosis of osteoblasts to a certain extent.

Key words: Chinese medicine; Osteoblast; Tonifying kidney and strengthening spleen; Apoptotic protein; Mechanism study

基金项目: 国家自然科学基金项目(81001532); 中国博士后基金(20100480737); 广东省自然科学基金项目(2014A030313748); 广东省科技计划项目(2013B021800162; 2010B030700076) 广州市珠江科技新星项目(2012J2200037; 佛山市科技创新平台建设项目(2013AG100022)

* 通讯作者: 李颖, Email: nhqzyy@163.com

细胞凋亡又称为程序性细胞凋亡 (Programmed Cell Death, PCD), 是指细胞在一定的生理或病理条件下, 遵循自身的程序, 自然死亡的过程^[1-2]。目前认为细胞内有三条凋亡途径, 即外源性途径、内源性途径和内质网途径, 而内质网的凋亡信号途径往往归并于内源性途径, 因此, 也可以认为有两条主要的信号途径。但这三条凋亡途径都是通过活化半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (Cysteine-aspartate specific protease, Caspase), 最终集中到线粒体来执行凋亡的过程^[3-4]。本实验在前期研究的基础上研究补肾健脾中药复方对成骨细胞内 Bcl-2、Bax 和 Bid 的影响, 以期探讨细胞凋亡信号和骨质疏松症的相关关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰兔 6 只, 3 月龄, 体重 2000 g - 2200 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证明编号: 0080824。所有新西兰兔均喂养在恒温、恒湿的清洁环境中喂养, 环境温度 (25 ± 1) °C, 湿度为 70%, 自由活动, 光照 12 小时, 黑暗 12 小时。供给标准固体饲料 (由广州中医药大学实验动物中心提供), 自由摄食水。实验过程中, 对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

1.2 实验药品

治疗组的药物采用补肾健脾中药复方, 该方由补骨脂、制淫羊藿、肉苁蓉、熟地、白芍、黄芪、菟丝子、丹参、当归、大枣等组成。该方的提取药物, 含生药量 1.43 g/ml, 由广州中医药大学附属骨伤科医院制剂室提供。

对照组选用的药物为戊酸雌二醇片, 由拜耳医药保健有限公司广州分公司提供 (国药准字 J20080036, 批号: 177A12)。

1.3 实验分组及给药方法

将 6 只健康新西兰兔随机分为 3 组, 每组 2 只, 分为正常组、治疗组和对照组。治疗组灌服补肾健脾中药复方, 对照组灌服戊酸雌二醇, 正常组灌服蒸馏水, 灌胃给药容积为 10 ml/kg。用药量以成人的用量推算动物用量, 根据人与动物及各类动物间药物剂量换算方法计算^[6], 其中治疗组的灌服药量为 1.096 g/kg, 对照组的灌服药量为 0.038 mg/kg。

1.4 含药血浆的制备

大白兔连续灌胃 1 周, 最后一次灌胃后 2 h, 分

别行心脏采血, 将获得的全血置于含抗凝剂的试管中, 5 - 10 min 后, 于 3000 × g 离心 15 min, 吸取上清, 即获取含药血浆, 再灭活, 抽滤除菌, 置 -20 °C 保存备用。

1.5 成骨细胞的分离、原代培养及传代

一日龄 SD 大鼠, 75% 酒精浸泡 15 分钟, 取出头盖骨, 剔除附着软组织, 0.25% 胰蛋白酶预消化, 0.1% II 型胶原酶消化, 离心, 获取细胞, PBS 液冲洗, 置于含 10% NCS-MEM 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 中静置培养, 每 2 天更换培养液 1 次, 弃去原培养液, 加入含 10% 的胎牛血清 MEM 进行培养, 培养 4 - 7 天, 单层细胞铺满培养瓶底。传代时, 弃去原培养液, 用 D-Hank's 液冲洗, 0.25% 胰蛋白酶消化, 弃去消化液, 加入培养液, 吹打培养瓶底, 使细胞脱落, 制成细胞悬液, 接种于新的培养瓶, 置 37 °C、5% CO₂ 中静置培养。

1.6 加含药血浆培养及细胞增殖的测定

细胞按 5 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板内, 接种第 2 天后, 细胞分 3 组分别更换培养液培养: 正常组、对照组和治疗组分别添加对应的含药血浆。每 2 天换液一次, 连续培养 1 周。采用 MTT 比色法记录第 2、4、6、8 天各组细胞的 OD 值, 波长为 490 nm。

1.7 引物设计合成

GenBank 上查找大鼠成骨细胞细胞株中 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 序列, 设计特异性引物, 所用软件为 Primer express 2.0 软件。仪器为 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪。序列如下:

Bax forward	CCGGGTGGTTCGCCCTTTTCTACT
Bax reverse	CACAAAGATGGTCACTGTCTGCC
Bcl-2 forward	GGTCATCTCTGTGGAGACCGTCA
Bcl-2 reverse	CGTCTTCAGACACAGCCAGGAGA
Bid forward	GGCGCTCCTTCTATCATGGAAGA
Bid reverse	GTCAATTCTCCATGTCCCTAGGGA
GAPDH forward	CCTCGTCTCATAGACAAGATGGT
GAPDH reverse	GGTAGACTCATACTGGAACATG

1.8 指标检测方法及结果计算

对大鼠成骨细胞细胞株总 RNA 提取, 抽提的总 RNA 应马上进行反转录: 取 2 μl RNA 模板做逆转录反应, 仪器为普通 PCR 仪器 K640 (杭州晶格科学仪器有限公司) 反转录反应程序: 30 °C 10 min, 42 °C 20 min, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min; 取 1 μl 反转录产物 (cDNA) 进行荧光定量 PCR。

结果计算可按 2^{-ΔΔCt} 来计算 (具体公式推导可参考文献: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen, 利用实时定量 PCR 技术通过 2^{-ΔΔCt} 方

法分析相对基因表达差异, METHODS 25, 402-408 (2001. doi: 10.1006/meth. 2001.1262, available online at <http://www.idealibrary.com> on), 其中 $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{处理组目的基因}) - Ct(\text{处理组内参基因})] - [Ct(\text{对照组目的基因}) - Ct(\text{对照组内参基因})]$ 。

1.9 统计学分析方法

用 SPSS 16.0 软件分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异分别采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 成骨细胞的增殖情况

选取四个时间点(2、4、6、8 天)检测成骨细胞的增殖情况,成骨细胞的增殖均随时间呈增高的趋势,在第 6 和 8 天里,治疗组和对对照组中的细胞增殖速

度均优于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组细胞的增殖速度在第 4、6 天均比对照组慢,差异有统计学意义($P < 0.05$),但至第 8 天时达最大值,明显优于对照组($P < 0.05$),因此,可以确定第 8 天为最佳实验时间。

2.2 各组成骨细胞中 Bcl-2、Bax 和 Bid 蛋白表达的情况

治疗组中成骨细胞 Bax 的相对表达量比对照组的相对表达量低,两者的差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组中成骨细胞 Bcl-2 的相对表达量比对照组的相对表达量低,两者的差异有统计学意义($P < 0.05$);但治疗组中 Bcl-2/Bax 比值相比对照组高,两者的差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组中成骨细胞 Bid 的相对表达量比对照组的相对表达量低,两者的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 成骨细胞的增殖情况($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The cell proliferation of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	2 天	4 天	6 天	8 天
正常组	10	0.183 ± 0.044	0.339 ± 0.068	0.415 ± 0.071	0.628 ± 0.097
治疗组	10	0.165 ± 0.035	0.385 ± 0.078*	0.609 ± 0.063**	0.876 ± 0.081**
对照组	10	0.159 ± 0.037	0.479 ± 0.061*	0.704 ± 0.107*	0.725 ± 0.059*

* 与正常组比较, $P < 0.05$; * 与对照组比较, $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal group; * $P < 0.05$ vs control group

表 2 各组成骨细胞中 Bcl-2、Bax 和 Bid 表达的情况($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The expression of Bcl-2, Bax, and Bid in osteoblasts in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Bax	Bid	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常组	10	0.077 ± 0.014	0.00044 ± 0.00003	0.096 ± 0.068	0.124 ± 0.023
治疗组	10	0.023 ± 0.011**	0.00025 ± 0.00011**	0.055 ± 0.023**	0.245 ± 0.046**
对照组	10	0.045 ± 0.009*	0.00037 ± 0.00009*	0.083 ± 0.021*	0.184 ± 0.038*

* 与正常组比较, $P < 0.05$; * 与对照组比较, $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal group; * $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

在凋亡途径中, Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) 家族起着非常重要的调控作用,其作用为双向的,分为抗凋亡和促凋亡两类,前者有 Bcl-2、Bcl-XL, 后者有 Bid、Bax、Bad、Bcl-Xs 等,它们发挥各自作用时都与 ROS 有关。Bax 是 Bcl-2 家族中促凋亡的成员,在刺激信号作用下 ROS 升高并上调 Bax 的表达, Bax 通过作用于线粒体通透转换孔,降低线粒体跨膜电势 ($\Delta\psi_m$),使线粒体释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF)^[7]。张锦等^[8]认为黄酮类化合物能抗氧化,从而抑制心肌细胞凋亡,主

要机制是通过线粒体死亡途径调节 Bcl-2 家族蛋白表达来发挥作用的。

Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白的代表。Degterev 等实验证实^[9] Bcl-2 和 Bcl-xL 通过其 BH3 结构域与 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白形成异二聚体,从而维持促凋亡成员在细胞内的定位分布,保护细胞不进入凋亡程序。Hengartner 等^[10]研究表明 Bcl-2 蛋白结构上无特殊性信号肽,但在氨基酸的 C 末端有一个 19 个氨基酸构成的疏水区,此区可将 Bcl-2 蛋白固定于细胞内膜上,对 Bcl-2 蛋白的生化机能的发挥起重要作用。体外实验证实 Bcl-2、Bcl-xL 等能在线粒体上形成离子通道,提示它们可能参与调

节一些与凋亡有关的细胞现象。过度表达的 Bcl-2 能抑制线粒体通透性改变,并影响线粒体通透转换孔的形成,从而抑制凋亡^[11-12]。

Bax 主要的生理功能是促进细胞的凋亡。当细胞损伤严重,则表现为调控 Bcl-2 表达减少,Bax 表达增多,Bcl-2/Bax 比例下降,Bcl-2 与 Bax 的异源二聚体减少,Bax 同源二聚体增多。Pavlović 等^[13]认为谷氨酸钠诱导胸腺细胞凋亡可能是由于 Bcl-2 表达的下调及 Bcl-2/Bax 比例变化所导致的。Bid 是 Bcl-2 家族蛋白中的一个促凋亡蛋白,是 Bcl-2 超家族成员中的 BH3-only 亚类的代表,即只含有保守的 BH(Bcl-2 homology)区域中的 BH3 区域^[14]。Kantari 等^[15]认为 Bid 的主要生理功能是促进细胞的凋亡,其促凋亡活性需要依赖 Caspase-8 的剪切。

在本实验中,经过含药血浆培养后的成骨细胞的 Bax 和 Bid 均出现不同的变化,中药复方含药血浆相比戊酸雌二醇含药血浆,能下调这两种蛋白的表达量。经过含药血浆培养后,尽管治疗组中 Bcl-2 的相对表达量低于对照组,但治疗组的 Bcl-2/Bax 的相对量高于对照组,说明治疗组中形成的异二聚体较对照组多。中药复方能较好地抑制成骨细胞中 Bax 和 Bid 的表达,尽管也对 Bcl-2 进行了抑制,但 Bcl-2/Bax 的相对量较高,可以在细胞内形成的较多的异二聚体,抵消了 Bcl-2 的不足。因此,认为中药复方的主要作用下调 Bcl-2 家族蛋白,有可能以下调促凋亡蛋白为主,但究竟是何种成分起到主要的作用,有待进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev.* 2015,23(Pt A):90-100.
- [2] Takahashi H, Tomita N, Sakata S, et al. Prognostic significance of programmed cell death-1-positive cells in follicular lymphoma patients may alter in the rituximab era. *Eur J Haematol.* 2013 Apr;90(4):286-290.
- [3] Fossati S, Cam J, Meyerson J, et al. Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid-beta variants in cells composing the cerebral vessel walls. *FASEB J.* 2010, 24(1):229-241.
- [4] MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004, 5(7):674-678. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 2008, 41(1):11-22.
- [5] 中华人民共和国科学技术部. 关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知. 畜牧兽医科技信息, 2007, 4:35-36.
- [6] 施新猷. 现代医学实验动物学. 北京:人民军医出版社, 2000:332-335.
- [7] Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001; 292 (5517): 727-730.
- [8] 张锦,赵翠翠,韩维娜,等. 黄酮类化合物对心肌细胞凋亡的作用. *中国药理学通报*, 2008;24(5):635-639.
- [9] Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, et al. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-XL. *Nat Cell Biol.* 2001, 3(2):173-182.
- [10] Hengartner MO, Horvitz HR. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell.* 1994, 76(4):665-676.
- [11] Hawkins BJ, Levin MD, Doonan PJ, et al. Mitochondrial complex II prevents hypoxic but not calcium- and proapoptotic Bcl-2 protein-induced mitochondrial membrane potential loss. *J Biol Chem.* 2010, 285(34):26494-26505.
- [12] Ascensão A, Lumini-Oliveira J, Machado NG, et al. Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clin Sci (Lond).* 2011, 120(1):37-49.
- [13] Pavlović V, Cekić S, Kocić G, et al. Effect of monosodium glutamate on apoptosis and Bcl-2/Bax protein level in rat thymocyte culture. *Physiol Res.* 2007, 56(5):619-626.
- [14] Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene.* 2008, 27 Suppl 1:S93-104. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis.* 2002, 7(5):433-440.
- [15] Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1813(4):558-563.

(收稿日期:2016-06-04;修回日期:2016-06-26)