

· 论 著 ·

Bcl2 促进 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 表达及补肾健脾活血方对其影响

王吉利^{1,3} 张志海^{2,3*} 黄宏兴^{2,3} 万雷^{2,3} 刘海全^{2,3} 柴爽^{1,3} 汪悦东^{1,3}

1. 广州中医药大学第三临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东 广州 510200

3. 广州中医药大学岭南医学研究中心中医骨伤科学实验室, 广东 广州 510405

中图分类号: R274 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 07-0841-07

摘要: **目的** 基于构建 Bcl2 沉默和过表达腺病毒观察 Bcl2 对成骨细胞骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 蛋白的调节作用及补肾健脾活血方对其影响。**方法** 将培养的 UMR-106 细胞分为空载腺病毒组 (沉默 Bcl2 空载腺病毒 NC-bcl2, 过表达 Bcl2 空载腺病毒 WT-bcl2)、Bcl2 腺病毒组 (沉默 Bcl2 腺病毒 sh-bcl2, 过表达 Bcl2 腺病毒 Ad-bcl2)、空载腺病毒 + 空白血清组 (NC-bcl2, WT-bcl2)、空载腺病毒 + 补肾健脾活血方含药血清组 (NC-bcl2 + ME, WT-bcl2 + ME)、腺病毒 + 空白血清组 (sh-bcl2, Ad-bcl2)、腺病毒 + 补肾健脾活血方血清组 (sh-bcl2 + ME, Ad-bcl2 + ME), 用 RT-qPCR 检测 Bcl2、OPG mRNA 的变化、应用免疫印迹 (Western Blot) 检测 Bcl2、OPG、BMP-2 的变化。**结果** ①荧光倒置显微镜观察包装腺病毒转染 UMR-106 细胞; ②在正常培养基中, 与 NC-bcl2 比较, sh-bcl2 可以降低 Bcl2、OPG、BMP-2 蛋白的表达 (P 均 < 0.05), 与 WT-bcl2 比较, Ad-bcl2 可以提高 Bcl2、OPG、BMP-2 蛋白的表达 (P 均 < 0.05); ③与 NC-bcl2 比较, RT-qPCR 显示 sh-bcl2 可以降低 Bcl2 mRNA 的表达, 但 OPG mRNA 无统计学意义; ④在大鼠血清干预中, 与空载腺病毒比较, 补肾健脾活血方含药血清均可以增加 BMP-2、OPG 蛋白表达 (P 均 < 0.05); 在 sh-bcl2 干预的细胞中, 补肾健脾活血方含药血清提高 BMP-2、OPG 蛋白的表达 (P 均 < 0.05); 在 Ad-bcl2 干预的细胞中, 中药干预后, BMP-2、OPG 未见明显变化。**结论** Bcl2 可以影响 BMP-2、OPG 蛋白的表达, 补肾健脾活血方可能通过作用于 Bcl2 影响成骨细胞成骨相关蛋白的表达。

关键词: 补肾健脾活血方; UMR-106 细胞; B 淋巴细胞瘤-2; 过表达/沉默; 骨形态发生蛋白 2; 骨保护素

Bcl2 promotes expression of BMP-2 and OPG and the effect of nourishing kidney, invigorating spleen, and promoting blood flow recipe on the protein expression in UMR-106 cells

WANG Jili^{1,3}, ZHANG Zhihai^{2,3}, HUANG Hongxing^{2,3}, WAN Lei^{2,3}, LIU Haiquan^{2,3}, CHAI Shuang^{1,3}, WANG Yuedong^{1,3}

1. The Third Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510200, China

3. The Lab of Orthopedics and Traumatology, Lingnan Chinese Medicine Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

* Corresponding author: ZHANG Zhihai, Email: 13725295793@139.com

Abstract: **Objective** By the construction of the silencing and overexpression adenovirus of Bcl2, to observe the effect Bcl2 on bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and osteoprotegerin (OPG), and the influence of nourishing kidney, invigorating spleen, and promoting blood flow recipe (Recipe). **Methods** UMR-106 cells were divided into vector group (silencing vector Bcl2, NC-bcl2, and overexpression vector Bcl2, WT-bcl2), Bcl2 adenovirus group (silencing Bcl2, sh-bcl2, and overexpression Bcl2, Ad-bcl2), vector adenovirus + blank serum group (NC-bcl2 and WT-bcl2), vector adenovirus + Recipe serum group (NC-bcl2 + ME and WT-bcl2 + ME), adenovirus + blank serum group (sh-bcl2 and Ad-bcl2), adenovirus + Recipe serum group (sh-bcl2 + ME and Ad-bcl2 + ME). Bcl2 and OPG mRNA were detected with RT-qPCR. The protein expressions of Bcl2, OPG, and BMP-2 were

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373653, 81674004, 81673786); 广东省科技计划项目 (2016ZC0096, 2016A020216024); 广东省自然科学基金项目 (2015A030313367); 广州市荔湾区科技计划项目 (201704041)

* 通讯作者: 张志海, Email: 13725295793@139.com

detected with Western blotting. **Results** 1) Adenovirus fluorescent in UMR-106 cells was observed with fluorescent inverted microscope. 2) In normal medium, compared with NC-bcl2, sh-bcl2 reduced the protein expressions of Bcl2, OPG, and BMP-2 ($P < 0.05$). Compared with WT-bcl2, the protein expressions of Bcl2, OPG, and BMP-2 were significantly improved in Ad-bcl2 ($P < 0.05$). 3) Compared with NC-bcl2, the mRNA expression of bcl2 decreased in sh-bcl2. However, mRNA expression of OPG had no significance. 4) Compared with vector adenovirus in rat serum intervention, the protein expressions of BMP-2 and OPG increased in Recipe serum ($P < 0.05$). The protein expressions of BMP-2 and OPG increased in the Recipe serum and sh-bcl2 intervention ($P < 0.05$). The protein expressions of BMP-2 and OPG had no significance in Ad-bcl2 intervention. **Conclusion** Bcl2 could affect the protein expressions of BMP-2 and OPG, and Recipe may affect the osteoclast-related protein expressions through Bcl2.

Key words: Nourishing kidney; invigorating spleen; and promoting blood flow recipe; UMR-106; Bcl2; overexpress/silencing; BMP-2; OPG

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量低, 组织微结构损坏, 骨脆性增加, 易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。凋亡作为细胞的一种死亡方式, 在调节骨质疏松形成的过程中发挥重要的作用^[2]。补肾健脾活血方由肉苁蓉、补骨脂、制淫羊藿等 10 味中药组成, 前期研究发现补肾健脾活血方可以提高 OVX 的骨密度^[3]和骨骼肌中 B 淋巴细胞瘤-2 (B lymphocyte tumor-2, Bcl-2) 蛋白表达^[4]。但是 Bcl2 作用于成骨细胞的机制和中药如何调节的研究尚少, 本研究通过构建沉默 Bcl2 和过表达 Bcl2 腺病毒, 过表达和沉默大鼠成骨细胞 UMR-106 中 Bcl2 的表达, 从凋亡因子 Bcl2 角度研究凋亡因子对成骨细胞成骨分化的影响, 及补肾健脾活血方对 Bcl2 凋亡损伤成骨细胞的保护作用, 为中药应用于临床提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

大鼠成骨细胞 UMR-106 购自中国科学院上海细胞库。补肾健脾活血方药物肉苁蓉、补骨脂、制淫羊藿等 10 味中药购买于广州中医药大学附属骨伤科医院。0.25% 胰酶、 α -MEM 培养基、胎牛血清、青链霉素混合液 (Gibco 公司, 美国), PBS (HyCione 公司, 美国), 蛋白质裂解液、一抗稀释液、ECL 化学发光试剂、蛋白测定试剂盒、凝胶配制试剂盒 (碧云天生物技术有限公司), 兔抗鼠多克隆抗体 Bcl2、兔抗鼠多克隆抗体 OPG (美国 Abcam 公司), 兔抗鼠多克隆抗体 BMP-2 (四正柏公司), 兔抗鼠 GAPDH 多克隆抗体、兔抗鼠 Tubulin 多克隆抗体 (ABclonal 公司), 二抗羊抗兔 HRP-IgG (CST 公司)。

1.2 仪器

高速冷冻离心机 (德国 sigma 公司), 涡旋混合器 (海门市其林贝尔仪器), 电泳仪/转膜仪 (BioRad

公司)、凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司), 组织破碎仪 (gering)、低速离心机 (Eppendorf)、水浴锅 (上海一恒)、生物安全柜 (the baker company)、HERACell 150i 细胞培养箱 (Thermo scientific)、LEICA DM IL 倒置荧光显微镜 (徕卡, 德国)。

1.3 方法

1.3.1 构建病毒: 提取大鼠肌肉组织总 RNA, 逆转录, 使用 TOYOBO NEO Plus, PCR 克隆, 用 $1 \times$ TAE 配制 1% 琼脂糖凝胶, 取 5 μ L 进行电泳 (120 V 约 30 min) 鉴定, 经过纯化, 胶回收, 酶切后, 分别取酶切的载体 pdc316-mcmv-eGFP 和 Bcl2 PCR 酶切产物, 菌落 PCR 鉴定及测序正确后, 将含正确目的基因序列的菌落接种于含 amp 抗性的 20 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 过夜摇菌, 提取去内毒素质粒, 使用含目的基因的 pdc316-mcmv-eGFP 与腺病毒骨架质粒 pBHG(δ)E1, 进行共转细胞, 腺病毒浓缩与纯化后进行后续实验。

1.3.2 细胞培养: UMR-106 细胞接种于含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 α -MEM 培养液中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下进行培养, 平均 3 d 换 1 次液, 2~3 d 进行 1 次传代, 传代培养至对数生长期备用。

1.3.3 含药血清制备: 将 12 周龄 SD 雌性大鼠分为 2 组, 对照组、中剂量组 (4.8 g/kg), 每日分 2 次给药, 期间间隔 8 h, 连续给药 7 d, 末次给药 1 h 后腹主动脉采血, 室温静置 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C, 3 000 r/min 离心 15 min, 弃上部血清, 56 $^{\circ}$ C 30 min 灭活, 用 22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.4 Bcl2 腺病毒干预及细胞分组: 将培养的 UMR-106 细胞随机分为空载腺病毒组 (沉默 Bcl2 空载腺病毒 NC-bcl2, 过表达 Bcl2 空载腺病毒 WT-bcl2)、Bcl2 腺病毒组 (沉默 Bcl2 腺病毒 sh-bcl2, 过表达 Bcl2 腺病毒 Ad-bcl2), 均用 α -MEM 培养液完全培养基, 贴壁后加入空载病毒和腺病毒, 过夜后换

液。同时连续作用 42 h。各组细胞培养结束后进行各项指标的检测。

1.3.5 中药含药血清干预及细胞分组:将培养的 UMR-106 细胞随机分为空载腺病毒 + 空白血清组(沉默 Bcl2 空载腺病毒 NC-bcl2, 过表达 Bcl2 空载腺病毒 WT-bcl2)、空载腺病毒 + 补肾健脾活血方含药血清组(沉默 Bcl2 空载药物组 NC-bcl2 + ME, 过表达 Bcl2 空载药物组 WT-bcl2 + ME)、Bcl2 腺病毒 + 空白血清组(沉默 Bcl2 腺病毒 sh-bcl2, 过表达 Bcl2 空载腺病毒 Ad-bcl2)、Bcl2 腺病毒 + 补肾健脾活血方含药血清组(沉默 Bcl2 腺病毒药物组 sh-bcl2 + ME, 过表达 Bcl2 腺病毒药物组 Ad-bcl2 + ME), 贴壁后分别加入空载病毒和腺病毒, 过夜后换液, 空载腺病毒组及 Bcl2 腺病毒药物组换空白血清, 空载腺病毒药物组和 Bcl2 腺病毒药物组换含药血清。同时连续作用 42 h。各组细胞培养结束后进行各项指标的检测。

1.3.6 PCR 检测 Bcl2、OPG 的表达:采用 Takara 试剂说明书提取细胞的总 RNA, 各组取 500ng 的 RNA 加入 dd H₂O 与逆转录试剂配成 10 μ L 体系, 以完成逆转, 以 cDNA 为模板按照 SYBR Premix Ex Taq II 说明书操作加入相应的试剂及引物最终成 15 μ L 体积进行 PCR 扩增, 具体反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环。以 BIO-RAD 型 PCR 热循环仪分析软件, 将相对定量值 RQ 及处理后 CT 值用于统计分析。引物序列如表 3。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Name		Primer sequence
Bcl2	Forward	5'-CAGGATAACGGAGGCTGGCATG-3'
	Reverse	5'-CCAGGTATGCACCCAGAGTGAT-3'
OPG	Forward	5'-GTGGAATAGATGTCACCTGTGC-3'
	Reverse	5'-TTTGCTCTTGCGAGCTGTGT-3'

1.3.7 Western blot 技术检测细胞成骨相关蛋白 BMP-2、OPG 表达情况:分别收集各组细胞, 含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 IP 裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度。以 20 μ g 蛋白/泳道上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 按比例配制 Bcl2、BMP-2、OPG 及 GADPH 一抗, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗。按 1:1 比例配制化学发光液, 将膜放在曝光板上, 应用全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统曝光分析图片。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件处理, 数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间采用独立样本 t 检验, 多组间应用 ANOVA 进行分析, F 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒转染 UMR-106 细胞

图 1 为病毒转染细胞后, 荧光显微镜拍摄, 显示沉默 Bcl2 基因、过表达 Bcl2 基因、空载腺病毒转染 UMR-106 细胞。

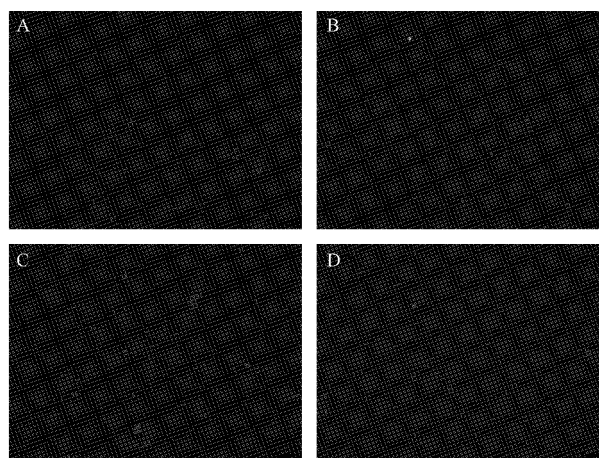


图 1 病毒转染细胞荧光表达

注: $\times 200$; A: Si 病毒转染, 浓度 12.8×10^8 μ L; B: NC 病毒转染, 浓度 12.8×10^8 μ L; C: sh-bcl2 病毒转染, 浓度 16×10^8 μ L; D: Ad-bcl2 病毒转染, 浓度 12.8×10^8 μ L

Fig. 1 Fluorescence expression of virus transfection cells

Note: $\times 200$; A: Si virus transfection, concentration 12.8×10^8 μ L; B: NC virus transfection, concentration 12.8×10^8 μ L; C: sh-bcl2 virus transfection, concentration of 16×10^8 μ L; D: Ad-bcl2 virus transfection, concentration of 12.8×10^8 μ L

2.2 病毒转染细胞 Bcl2 的表达

在 UMR-106 细胞中, 与 NC-bcl2 比较, Sh-bcl2 可以降低 Bcl2 的表达 ($P < 0.05$)、沉默 Bcl2 蛋白的表达; 与 WT-bcl2 比较, Ad-bcl2 可以增加 Bcl2 的表达 ($P < 0.05$), 过表达 Bcl2 蛋白, 腺病毒构建成功, 可以进行后续实验。见图 2。

2.3 bcl2 对成骨细胞 BMP-2、OPG 的表达

在 UMR-106 细胞中, 与 NC-bcl2 比较, sh-bcl2 可以降低 BMP-2、OPG 蛋白的表达 (均 $P < 0.05$); 与 WT-bcl2 比较, Ad-bcl2 可以提高 BMP-2、OPG 蛋白的表达 (均 $P < 0.05$)。Bcl2 可以作用于成骨细胞, 促进成骨相关蛋白 BMP-2、OPG 蛋白的表达。见图 3。

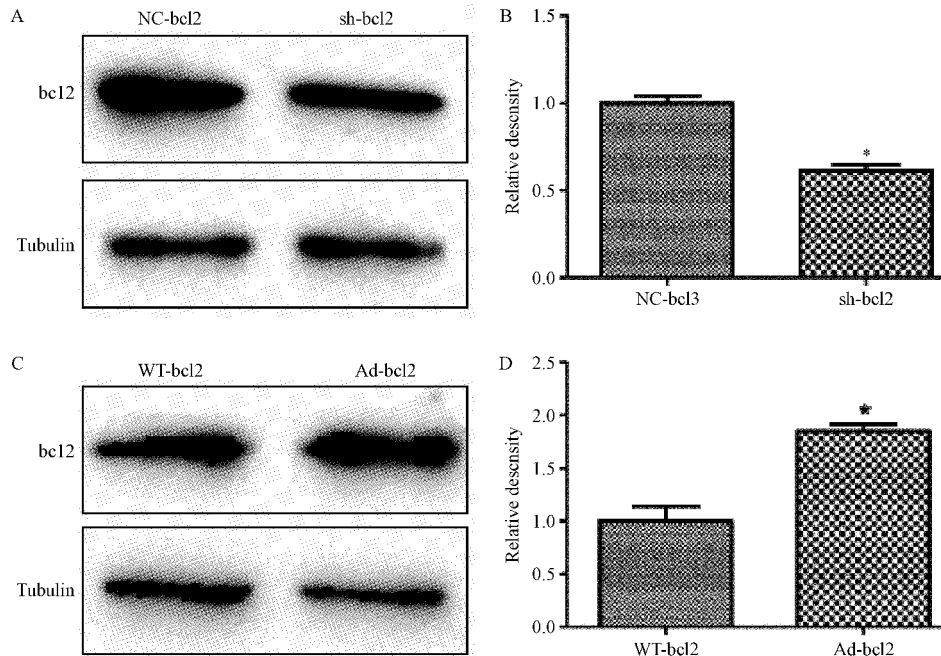


图 2 sh-bcl2 和 Ad-bcl2 干预 UMR-106 细胞 bcl2 蛋白表达

注:与空载腺病毒比较; * $P < 0.05$; A: sh-bcl2 干预 UMR-106 细胞 Bcl2 蛋白表达; B: sh-bcl2 干预 UMR-106 细胞 bcl2 灰度分析; C: Ad-bcl2 干预 UMR-106 细胞 Bcl2 蛋白表达; D: Ad-bcl2 干预 UMR-106 细胞 bcl2 灰度分析

Fig. 2 Bcl2 protein expression interfered by sh-bcl2 and Ad-bcl2,

Note: compared with Black adenovirus; * $P < 0.05$; A: Bcl2 protein expression interfered by sh-bcl2 in UMR-106 cells; B: Bcl2 grayscale analysis interfered by sh-bcl2 in UMR-106 cells; C: Bcl2 protein expression interfered by Ad-bcl2 in UMR-106 cells; D: Bcl2 grayscale analysis interfered by Ad-bcl2 in UMR-106 cells

2.4 Bcl2 对 bcl2、OPG mRNA 的表达

在 UMR-106 细胞中, sh-bcl2 降低 Bcl2 基因的表达 ($P < 0.05$), 沉默和过表达 Bcl2 后, mRNA OPG 的表达未见明显变化。沉默和过表达 Bcl2 可能没有影响到 OPG 基因改变。见表 2、表 3。

表 2 sh-Bcl2 干预 UMR-106 细胞 Bcl2、OPG mRNA 的表达
Table 2 Bcl2 and OPG mRNA expression interfered by sh-Bcl2 in UMR-106 cells

Item	Bcl2	OPG
NC-bcl2	1.00 ± 0.68	1.00 ± 0.18
Sh-bcl2	0.74 ± 0.10 *	0.93 ± 0.23

注: * $P < 0.05$

表 3 Ad-Bcl2 干预 UMR-106 细胞 OPG mRNA 的表达
Table 3 OPG mRNA expression interfered by Ad-Bcl2 in UMR-106 cells

Item	OPG
WT-bcl2	1.08 ± 0.13
Ad-bcl2	0.93 ± 0.11

2.5 中药对沉默和过表达 Bcl2 后 BMP-2、OPG 的影响

在空载腺病毒干预中, 与大鼠空白血清相比, 大鼠补肾健脾活血方含药血清干预细胞后, 均可以增

加 BMP-2、OPG 蛋白的表达, 但是在过表达 Bcl2 中, 补肾健脾活血方含药血清不影响 BMP-2 蛋白的表达; 在空白血清干预的细胞中, sh-bcl2 可以抑制 BMP-2、OPG 蛋白的表达, Ad-bcl2 起到相反的作用; 在 sh-bcl2 干预的细胞中, 含药血清提高 BMP-2、OPG 蛋白的表达; 在 Ad-bcl2 干预的细胞中, 中药干预后, BMP-2、OPG 未见明显改变。见图 4。

3 讨论

OP 在古籍文献中尚无明确记载, 多将其归属于《黄帝内经》中“骨痹”、“骨痿”等范畴。单纯依靠补钙或抗骨质疏松等药物防治 OP, 方法显得较为单薄, 而依靠中医药理论及治疗方法在预防该病方面优势凸显^[5]。中医认为 OP 的发生与肾虚、脾虚、血瘀有关, 因此 OP 治疗原则为补肾、健脾、活血, 故多以补肾、健脾、活血药物辅助治疗骨病^[6], 在中医理论的指导下, 补肾健脾活血方由右归饮(《景岳全书》)合肉苁蓉汤(《圣济总录》)加减化裁而来, 进而治疗骨质疏松。

中老年人由于机能的退化, 成骨细胞和破骨细

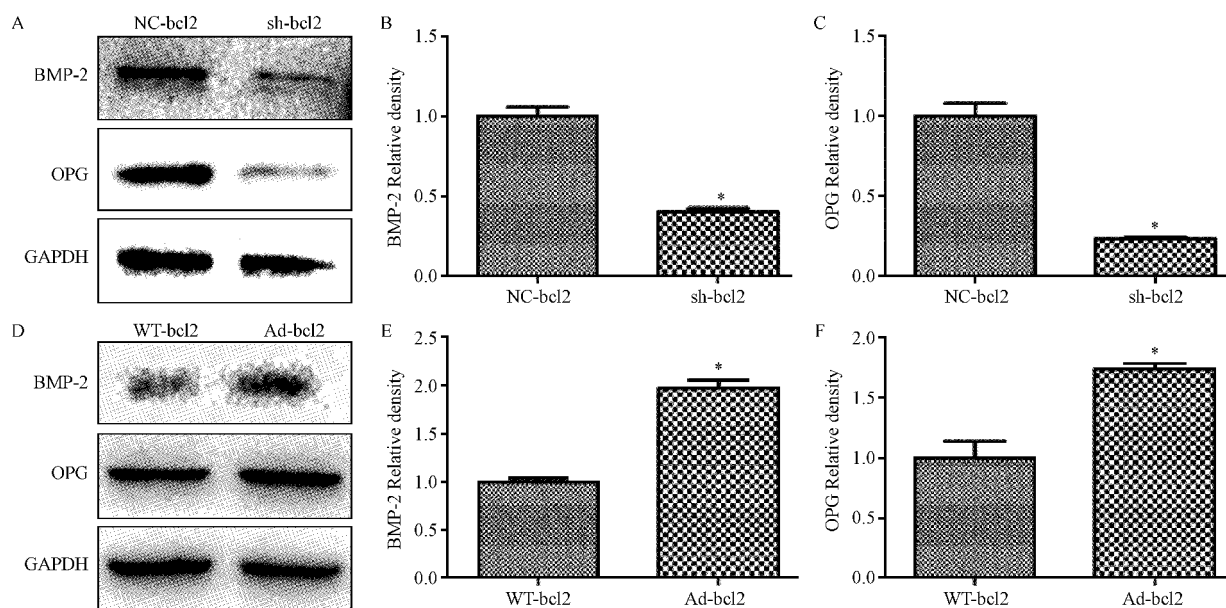


图3 sh-bcl2 和 Ad-bcl2 干预 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达

注: * $P < 0.05$; A: sh-bcl2 病毒干预 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达; B: sh-bcl2 病毒干预 UMR-106 细胞 BMP-2 灰度分析; C: sh-bcl2 病毒干预 UMR-106 细胞 OPG 灰度分析; D: Ad-bcl2 病毒干预 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达; E: Ad-bcl2 病毒干预 UMR-106 细胞 BMP-2 灰度分析; F: Ad-bcl2 病毒干预 UMR-106 细胞 OPG 灰度分析

Fig. 3 BMP-2 and OPG protein expression interfered by sh-bcl2 and Ad-bcl2

Note: * $P < 0.05$; A: BMP-2 and OPG protein expression interfered by sh-bcl2 virus in UMR-106 cells; B: BMP-2 grayscale analysis interfered by sh-bcl2 virus in UMR-106 cells; C: OPG grayscale analysis interfered by sh-bcl2 virus in UMR-106 cells; D: BMP-2 and OPG protein expression interfered by Ad-bcl2 virus; E: BMP-2 grayscale analysis interfered by Ad-bcl2 virus in UMR-106 cells; F: OPG grayscale analysis interfered by Ad-bcl2 virus in UMR-106 cells

胞平衡失调^[7],容易发生 OP。在 OP 与非 OP 患者标本中发现血清和骨组织中 Bcl-2 表达与腰椎骨密度呈正相关^[8, 9],Moriishi 等^[2]研究发现过表达 Bcl2 可以抑制成骨细胞分化,同时抑制骨细胞进程,诱导骨细胞凋亡,因此在 OP 发生过程中 Bcl2 发挥重要的作用。目前认为 Bcl2 作用于细胞主要通过这几个方面:① Bcl2 可以抑制内质网管中 Ca^{2+} 的释放^[10];② Bcl2 氧化还原机制, H_2O_2 在 Bcl2 半胱氨酸氧化作用中作为一个潜在的因素直接调节细胞凋亡^[11];③ Bcl2 与 Bax 的相互作用,与 Bax 形成异源二聚体,从而抑制细胞凋亡^[12];④ Bcl2 可与胞外信号调节激酶 ERK1/2 形成 Bcl2-ERK 复合物而抑制细胞凋亡^[13]。在凋亡家族中,过表达 BCLXL 可以抑制成骨细胞的凋亡,增加骨量和骨强度^[14],在 Bcl2 (-/-) 小鼠中 Bcl2 可能抑制破骨细胞进而增加骨量^[15],近期研究^[16]发现高重力 (20 g) 不仅可抑制成骨细胞增殖,促进细胞凋亡,还可导致成骨细胞发生变性坏死,但适当浓度 (10 μ g/L) 的淫羊藿苷可逆转高重力加载所导致的不利影响,对成骨细胞起相应的保护作用。

BMP-2 是转化生长因子 β 超家族的重要成员,具有促骨形成和异位成物的生物特征,BMPs 是经典 BMPs/Smad 通路的重要配体^[17],也可以直接通过 Wnt/ β -catenin 通路增加 Wnt1、LEF/TCFs 等蛋白的表达^[18];OPG 是破骨细胞中 OPG-RANKL-RANK 的重要通路蛋白,成骨细胞分泌 OPG 与 RANK 竞争性结合 RANKL,阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合,抑制 OC 的分化^[19, 20]。本实验结果显示,在成骨细胞 UMR-106 细胞中,腺病毒沉默 Bcl2 后,与空载腺病毒比较,可以降低 BMP-2、OPG 的蛋白的表达,但是 OPG mRNA 基因未见明显变化;过表达 Bcl2 腺病毒与空载腺病毒比较,过表达 Bcl2 可以增加 BMP-2、OPG 蛋白的表达,在 Moriishi 等研究中,过表达 Bcl2 对原代成骨细胞基因 OPG 没有影响^[2],在本实验中过表达 Bcl2 可以提高 OPG 蛋白的表达,两者的实验对象不同,Moriishi 等用的是原代成骨细胞,检测 mRNA,而本次实验用的是 UMR-106 细胞,检测蛋白;在沉默和过表达 Bcl2 腺病毒中,OPG mRNA 表达未见明显变化,其具体的作用机制有待进一步研究;中药干预细胞后,可以提高沉

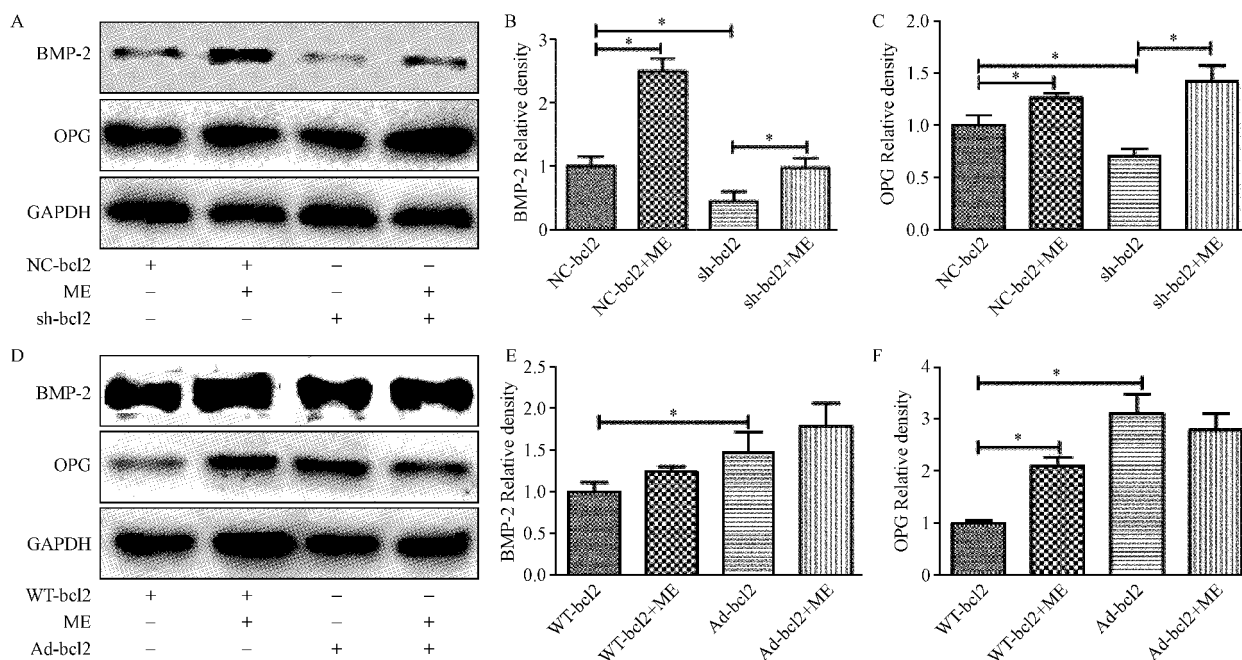


图 4 中药分别于 sh-bcl2、Ad-bcl2 干预 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达

注: * $P < 0.05$; A: sh-bcl2 病毒和中药干预 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达; B: sh-bcl2 病毒和中药 UMR-106 细胞表达 BMP-2 灰度分析; C: sh-bcl2 病毒和中药干预 UMR-106 细胞表达 OPG 灰度分析; D: Ad-bcl2 病毒和中药干预 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达; E: Ad-bcl2 病毒和中药干预 UMR-106 细胞表达 BMP-2 灰度分析; F: Ad-bcl2 病毒和中药干预 UMR-106 细胞表达 OPG 灰度分析

Fig. 4 BMP-2 and OPG protein expression interfered by traditional Chinese medicine with sh-bcl2 and Ad-bcl2,

Note: * $P < 0.05$; A: BMP-2 and OPG protein expression interfered by sh-bcl2 virus and traditional Chinese medicine interfering in UMR-106 cells; B: BMP-2 grayscale analysis interfered by sh-bcl2 virus and TCM in UMR-106 cells; C: OPG grayscale analysis interfered by sh-bcl2 virus and TCM intervention in UMR-106 cells; D: BMP-2 and OPG protein expression interfered by Ad-bcl2 virus and traditional Chinese medicine; E: BMP-2 grayscale analysis interfered by Ad-bcl2 virus and TCM intervention in UMR-106 cells; F: OPG grayscale analysis interfered by Ad-bcl2 virus and TCM intervention in UMR-106 cells

默腺病毒引起的 BMP-2、OPG 的蛋白表达,但是在过表达 Bcl2 基因中,中药对 BMP-2、OPG 蛋白未见明显作用,可能中药作用于 UMR-106 细胞与 Bcl2 的蛋白表达量有关。

综上所述,沉默 Bcl2 可以抑制 BMP-2、OPG 蛋白的表达,OPG mRNA 无明显变化,过表达 Bcl2 可以促进 BMP-2、OPG 蛋白的表达,沉默 Bcl2 基因,补肾健脾活血方上调成骨相关蛋白 BMP-2、OPG 蛋白的表达,但是在过表达 Bcl2 的细胞中,中药没有提高 BMP-2、OPG 蛋白的表达,补肾健脾活血方可能通过凋亡蛋白促进成骨相关蛋白 BMP-2、OPG 蛋白的表达,发挥保护 UMR-106 细胞的成骨分化,进而防治 OP 的发生,但在此过程中是否有其他凋亡蛋白的参与,以及是否发生了级联反应,有待进一步深入研究。

【参 考 文 献】

[1] NIH Consensus. Development panel on osteoporosis prevention,

diagnosis, and therapy, March 7-29, 2000; highlights of the conference[J]. South Med J, 2001, 94(6): 569-573.

[2] Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, et al. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27487.

[3] 黄宏兴,李颖,刘庆思,等. 补肾方对骨质疏松模型大鼠骨密度及胰岛素样生长因子 I 和肿瘤坏死因子 α 的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008(37): 7219-7222.

Huang HX, Li Y, Liu QS, et al. Effects of Chinese herbs of tonifying kidney on bone mineral density and contents of insulin-like growth factor-1 and tumor necrosis factor- α in osteoporotic rats[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008(37): 7219-7222. (in Chinese)

[4] 李颖,吴伙燕,黄宏兴. 补肾健脾方对去势大鼠骨骼肌 Bcl-2、Caspase 蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(16): 3886-3888.

Li Y, Wu HY, Huang HX. Effect of the Chinese Herbal compound for tonifying kidney and strengthening spleen on Bcl-2 and Caspase in ovariectomized rats[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 33(16): 3886-3888. (in Chinese)

(下转第 873 页)

- with type 2 diabetes. Chinese Journal of Geriatrics, 2013, 32 (11): 1206-1208.
- [15] 李会会, 姜涛. 老年 2 型糖尿病肾病患者骨密度及其相关因素. 中国老年学杂志, 2012, 32 (13): 2711-2713.
- Li HH, Jiang T. Bone mineral density and related factors in elderly patients with type 2 diabetic nephropathy. Chinese Journal of Gerontology, 2012, 32 (13): 2711-2713. (in Chinese)
- [16] 蒋兰兰, 朱剑, 吴锦丹, 等. 绝经后 2 型糖尿病患者不同部位骨密度的变化情况及影响因素. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18 (3): 229-233.
- Jiang LL, Zhu J, Wu JD, et al. The variation of bone mineral density of various skeletal sites in postmenopausal women with type 2 diabetes and the influential factors. Chin J Osteopor, 2012, 18 (3): 229-233. (in Chinese)
- [17] 高明, 王涤非, 林奕辰, 等. 糖尿病肾病患者骨密度及骨代谢标志物的临床研究. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20 (2): 166-170.
- Gao M, Wang DF, Lin YC, et al. Clinical study of bone mineral density and bone metabolism markers in patients with diabetic nephropathy. Chin J Osteopor, 2014, 20 (2): 166-170. (in Chinese)
- (收稿日期: 2017-12-08; 修回日期: 2018-01-11)
-
- (上接第 846 页)
- [5] 笪巍伟, 赵永见, 兰儒贤, 等. 健脾补肾方增加 β -catenin、Runx2 表达而促进骨质疏松性骨折愈合的疗效观察[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23 (6): 719-726.
- Da WW, Zhao YJ, Lan RX, et al. The efficacy of the invigorating spleen and nourishing kidney formula on promoting osteoporotic fracture healing by increase of the expression of β -catenin and Runx2 [J]. Chin J Osteoporos, 2017, 23 (6): 719-726. (in Chinese)
- [6] 曲崇正, 刘庆恩. 刘庆恩教授防治原发性骨质疏松症经验概述[J]. 中医临床研究, 2015 (27): 3-5.
- Qu CZ, Liu QS. Experience of prevention and treatment of osteoporosis from Professor LIU Qing-si [J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2015 (27): 3-5. (in Chinese)
- [7] Kawakami A, Nakashima T, Tsuboi M, et al. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247 (1): 46-51.
- [8] 曾国勇. Bcl-2、Bak 与骨质疏松症及其中医证型的相关性研究[D]. 广州中医药大学, 2016.
- Zeng GY. The study of correlation between Bcl-2, Bak and osteoporosis and CM Syndromes [D]. Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016. (in Chinese)
- [9] 肖本浩. 绝经后骨质疏松症中医证型与血清中 Bcl-2、Bak 的相关性研究[D]. 广州中医药大学, 2017.
- Xiao BH. The study of the correlation between syndrome Traditional Chinese Medicine of postmenopausal types of osteoporosis and serum protein Bcl-2 and Bak [D]. Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017. (in Chinese)
- [10] Chami M, Prandini A, Campanella M, et al. Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca^{2+} signaling, which do not depend on their putative pore-forming region [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (52): 54581-54589.
- [11] Luanpitpong S, Chanvorachote P, Stehlik C, et al. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells [J]. Mol Biol Cell, 2013, 24 (6): 858-869.
- [12] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak [J]? Cell Cycle, 2007, 6 (24): 3043-3047.
- [13] Luanpitpong S, Chanvorachote P, Stehlik C, et al. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells [J]. Mol Biol Cell, 2013, 24 (6): 858-869.
- [14] Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, et al. Overexpression of BCLXL in Osteoblasts Inhibits Osteoblast Apoptosis and Increases Bone Volume and Strength [J]. J Bone Miner Res, 2016, 31 (7): 1366-1380.
- [15] Yamashita J, Datta NS, Chun YH, et al. Role of Bcl2 in osteoclastogenesis and PTH anabolic actions in bone [J]. J Bone Miner Res, 2008, 23 (5): 621-632.
- [16] 李军, 宋光明, 孙明林, 等. 淫羊藿苷对高重力下成骨细胞 MC3T3-E1 增殖与凋亡的影响 [J]. 中国医药导报, 2017, 14 (6): 19-23.
- Li J, Song GM, Sun ML, et al. Effects of icariin on proliferation and apoptosis of osteoblasts MC3T3-E1 cells under hypergravity, China Medical Herald, 2017, 14 (6): 19-23. (in Chinese)
- [17] Cheng Q, Tang W, Sheu T J, et al. Circulating TGF- β 1 levels are negatively correlated with sclerostin levels in early postmenopausal women [J]. Clin Chim Acta, 2016, 455: 87-92.
- [18] Itasaki N, Hoppler S. Crosstalk between Wnt and bone morphogenic protein signaling: a turbulent relationship [J]. Dev Dyn, 2010, 239 (1): 16-33.
- [19] Bai Y D, Yang F S, Xuan K, et al. Inhibition of RANK/RANKL signal transduction pathway: a promising approach for osteoporosis treatment [J]. Med Hypotheses, 2008, 71 (2): 256-258.
- [20] Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, et al. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2011, 16: 21-30.
- (收稿日期: 2018-01-30; 修回日期: 2018-02-25)