

· 论 著 ·

中药复方鹿角胶丸通过 PI3-K/AKT 信号通路调节破骨细胞凋亡

于冬冬^{1*} 赵丹阳² 姚啸生¹

1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032

2. 沈阳市第一人民医院神经内科, 辽宁 沈阳 110032

中图分类号: R459.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 07-0874-05

摘要: **目的** 探索中药复方鹿角胶丸促进破骨细胞凋亡机制的实验研究。**方法** RAW264.7 细胞培养并传代, RANKL + M-CSF 诱导 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化; MTS 检测不同浓度的鹿角胶丸对破骨细胞增殖活性影响; 倒置相差显微镜观察鹿角胶丸对破骨细胞形态学的影响; 流式细胞仪检测鹿角胶丸及加入 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 后对破骨细胞凋亡的影响; Western blot 检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Cleaved-Caspase-3、p-AKT、T-AKT 的蛋白表达情况, 以及检测加入 LY294002 后对凋亡通路蛋白的影响。**结果** MTS 显示各个浓度的鹿角胶丸(LJJW 高、中、低)均能抑制破骨细胞的增殖活性, 其中以 LJJW(中浓度)作用 24 h 后具有明显的增殖活性抑制作用。加入鹿角胶丸后, 破骨细胞透光度下降, 凋亡的细胞皱缩, 漂浮于培养基中。流式细胞仪检测结果显示鹿角胶丸促进破骨细胞凋亡, 预处理 LY294002 后, 鹿角胶丸的促破骨细胞凋亡作用受到抑制。免疫印迹结果显示, 鹿角胶丸促进线粒体 Bax 表达, 抑制 Bcl-2 的表达, 同时促进 Caspase-3 的裂解。鹿角胶丸促进 AKT 磷酸化, 加入 LY294002 后 AKT 的磷酸化受到抑制, 预处理 LY294002 后鹿角胶丸的促 AKT 磷酸化作用被抑制。**结论** 中药复方鹿角胶丸通过 PI3K/AKT 通路促进破骨细胞凋亡。

关键词: 中医中药; 鹿角胶丸; 破骨细胞; 凋亡

Chinese medicine compound antler pill promotes osteoclast apoptosis through PI3K/AKT pathway

YU Dongdong^{1*}, ZHAO Danyang², YAO Xiaosheng¹

1. Department of Orthopedics, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

2. Department of Neurology, Shenyang First People's Hospital, Shenyang 110041, China

* Corresponding author; YU Dongdong, Email: dongdongyu10256@163.com

Abstract: Objective To explore the mechanism of osteoclast apoptosis promoted by traditional Chinese medicine compound antler pill. **Methods** RAW264.7 cells were cultured and passaged. RAW264.7 cells were induced into osteoclasts by RANKL + M-CSF. The proliferation of osteoclasts under different concentrations of antler pill was detected with MTS. The osteoclast morphology was observed after the treatment of antler pill. The apoptosis of osteoclasts was detected using flow cytometry. Western blotting was used to detect the protein expression of Bax, Bcl-2, caspase-3, cleaved-caspase-3, p-AKT, and T-AKT. **Results** MTS result showed that antler pill inhibited osteoclast proliferation at all concentrations, and at the middle concentration of osteoclast proliferation was inhibited obviously after 24 h. After addition of antler pill, the transmittance of osteoclasts decreased, and apoptotic cells shrunk and floated in the culture medium. Flow cytometry result showed that antler pill promoted apoptosis of osteoclasts. Pretreatment with LY294002 blocked the effect of antler pill on osteoclast apoptosis. Western blotting result showed that antler pill promoted mitochondrial Bax expression, inhibited the expression of Bcl-2, and promoted the cleavage of caspase-3. Phosphorylation of AKT promoted by antler pill was inhibited by LY294002 pretreatment. **Conclusion** Chinese medicine compound antler pill promotes osteoclast apoptosis through PI3K/AKT pathway.

Key words: Chinese traditional medicine; Antler pill; Osteoclast; Apoptosis

基金项目: 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L201621); 辽宁省自然科学基金重点项目(20170540597); 沈阳市科技局科技人才应用技术研究计划(18-014-4-47)

* 通讯作者: 于冬冬, Email: dongdongyu10256@163.com

糖皮质激素性骨质疏松症 (GIOP) 是临床的常见病、多发病,其发病机制目前还不清楚。研究发现,GIOP 中破骨细胞的凋亡受到抑制^[1]。

中医理论认为“补肾填精壮骨法”是治疗骨质疏松症根本治法,其中《太平圣惠方》中的“鹿角胶丸”具有促进骨形成、抑制骨吸收^[2]、防治骨质疏松症之功效^[3]。同时,本研究者在临床工作中使用中药复方鹿角胶治疗糖皮质激素性骨质疏松症患者,收获很好的临床疗效。

因此,本研究在中医理论的基础上,从破骨细胞凋亡调节机制入手,应用分子生物学技术,研究中药方剂鹿角胶丸能否调节破骨细胞凋亡,为其临床防治糖皮质激素性骨质疏松症提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞:SPF 级 SD 雌性大鼠 24 只,体质量 300 ± 10 g,按随机数字表法分为 4 组各 6 只,以制备含药血清,大鼠均由辽宁长生生物技术有限公司提供(许可证号 SCXK(辽)2015-0001)。

1.1.2 药物及试剂:本实验中药饮片均在辽宁中医药大学附属医院购买。中药复方鹿角胶丸组成:由鹿角胶 3 g,附子 10 g,肉桂 5 g,杜仲 10 g,山茱萸 10 g,菟丝子 12 g,熟地黄 10 g,肉苁蓉 10 g,五味子 5 g,牛膝 10 g,巴戟天 5 g。将药制备为水煎剂,生药量为 1 g/mL。

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞(ATCC,美国),sRANKL (Peprotech,美国),M-CSF (Peprotech,美国),DMEM (Hychone,美国),进口胎牛血清 (Hychone,美国),细胞凋亡检测试剂盒(碧云天,中国),Bax、Bcl-2、Caspase-3、Cleaved-Caspase-3、p-AKT、T-AKT(CTS,美国),辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(CTS,美国)。

1.1.3 仪器:细胞孵箱(Thermo,美国);倒置相差显微镜(Olympus,日本);流式细胞仪(BD,美国);AMR-100 酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司,中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清制备与实验分组:24 只大鼠按随机数字表法分为空白对照组、中药复方鹿角胶丸(LJJW 高、中、低)组,6 只/组。以每 kg 体重大鼠的给药量为正常人给药量 6.3 倍,每次大鼠给药量以正常人给药量的 LJJW 高(3 倍等效量)、LJJW 中(等效量)、LJJW 低(1/3 等效量)倍计算,计算后为 7.29、2.43、0.81 g/kg 体重,LJJW 高浓度组加水煎

致 4 mL 液体量,其他组根据比例进行稀释,每日灌服 2 次,每次灌服 2 mL,空白对照组灌服等体积的蒸馏水。第 4 天早晨给药 2 h 后麻醉,腹主动脉取血后静置 2 h,离心($2\,500\text{ r/min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min)后收集血清, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 浴灭活 30 min 后分装, $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 小鼠单核/巨噬细胞 RAW 264.7 培养及诱导分化:未分化的小鼠单核/巨噬细胞 RAW 264.7,培养在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清,不含抗生素, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)。细胞接种于 6 孔板内,细胞密度 1×10^4 /孔,24 h 后换成诱导分化培养液培(DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清、20 ng/mL RANKL、20 ng/mL M-CSF)继续培养 5 d。

1.2.3 MTS 检测细胞增殖活性:细胞分对照(Control)、鹿角胶丸高、中、低浓度组(LJJW 高、中、低)。细胞平铺(5×10^3 细胞/孔)96 孔平板中,24 h 后更换分化培养基(药物处理组的血清终浓度为 15%),细胞经处理 3、12、24、48、72 h 后,每孔加 20 μL CellTiter 96 $\odot$ Aqueous One Solution Reagent。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中孵育 1 h。490 nm 读取吸光度值。 $\text{OD 值} = (\text{处理后细胞 OD 值} - \text{对照组细胞 OD 值})/N$, $n > 3$ 。

1.2.4 流式细胞仪检测:细胞分 Control、LJJW(中)、LY294002、LJJW(中) + LY294002 组。收取细胞后 PBS 洗涤,细胞重悬于 195 μL 结合缓冲液。避光与 5 μL Annexin V FITC 和 PI 10 μL 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。孵育后加入 300 μL 结合缓冲液进行流式细胞仪分析 $n > 3$ 。

1.2.5 Western Blot 检测:细胞分 Control、LJJW、LY294002、LJJW + LY294002 组。细胞加入裂解液提取蛋白,BCA 法定量蛋白。取 20 μg 蛋白样品,于 10% 聚丙烯酰胺凝胶上行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后 100 V 电转印至 PVDF 膜上。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h、一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。辣根过氧化物酶(HRP)标记的稀释二抗孵育,ECL 发光法曝光成像,扫描入电脑, $n > 3$ 。Image J 软件测定平均灰度值。

1.3 统计学处理

SPSS13.0 软件进行统计分析,采用 ANOVA 方法,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鹿角胶丸抑制破骨细胞增殖活性

MTS 方法对破骨细胞增殖活性进行检测(图 1),结果显示,各个浓度的鹿角胶丸(LJJW 高、中、

低)均能抑制破骨细胞的增殖活性($P < 0.05$,与对照组相比较),其中以 LJJW(中浓度)作用 24 h 后具有较大的增殖活性抑制作用。因此 LJJW(中浓度)及 24 h 作为实验用药浓度及作用时间。

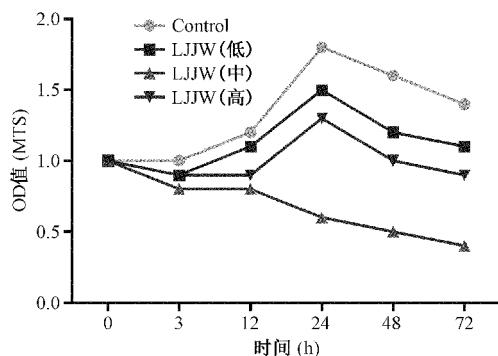


图1 鹿角胶丸抑制破骨细胞增殖

Fig. 1 Antler pill inhibited proliferation of osteoclasts

2.2 破骨细胞的形态学观察

倒置相差显微镜观察细胞形态(图2),对照组的破骨细胞呈圆形,透光度好,边界清晰,无触角,贴于培养瓶底部。加入鹿角胶丸后,细胞明显老化,可见触角,细胞略呈短梭形,细胞透光度下降,紧密贴附于瓶底,凋亡细胞皱缩,漂浮于培养基中。诱导分化培养基诱导细胞融合,最后形成巨大的多核破骨细胞。

2.3 LJJW 通过 PI3K/AKT 通路抑制破骨细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示鹿角胶丸促进破骨细胞

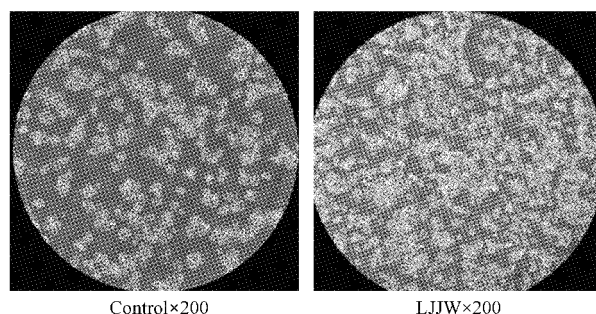


图2 形态学观察鹿角胶丸促进破骨细胞凋亡

Fig. 2 Morphological observation of osteoclast apoptosis promoted by antler pill

细胞凋亡(图3),对照组细胞的凋亡率为 $1.20\% \pm 0.05\%$,加入鹿角胶丸后破骨细胞的凋亡增加达 $8.50\% \pm 0.15\%$ ($P < 0.01$,与对照组相比较),单独加入 PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 后对破骨细胞的凋亡影响不明显 $1.00\% \pm 0.04\%$ ($P > 0.05$,与对照组相比较),预处理 LY294002,鹿角胶丸的促细胞凋亡作用受到抑制,细胞凋亡率为 $3.00\% \pm 0.16\%$ ($P < 0.05$,与对照组相比较)。

2.4 Western Blot 结果

进一步分析鹿角胶丸促进破骨细胞凋亡的潜在机制(图4 A、B、C),免疫印迹结果显示,鹿角胶丸促进线粒体 Bax 表达,抑制 Bcl-2 的表达,同时促进 Caspase-3 的裂解($P > 0.05$,与对照组相比较)。同时通路蛋白显示,鹿角胶丸促进 AKT 磷酸化,加入

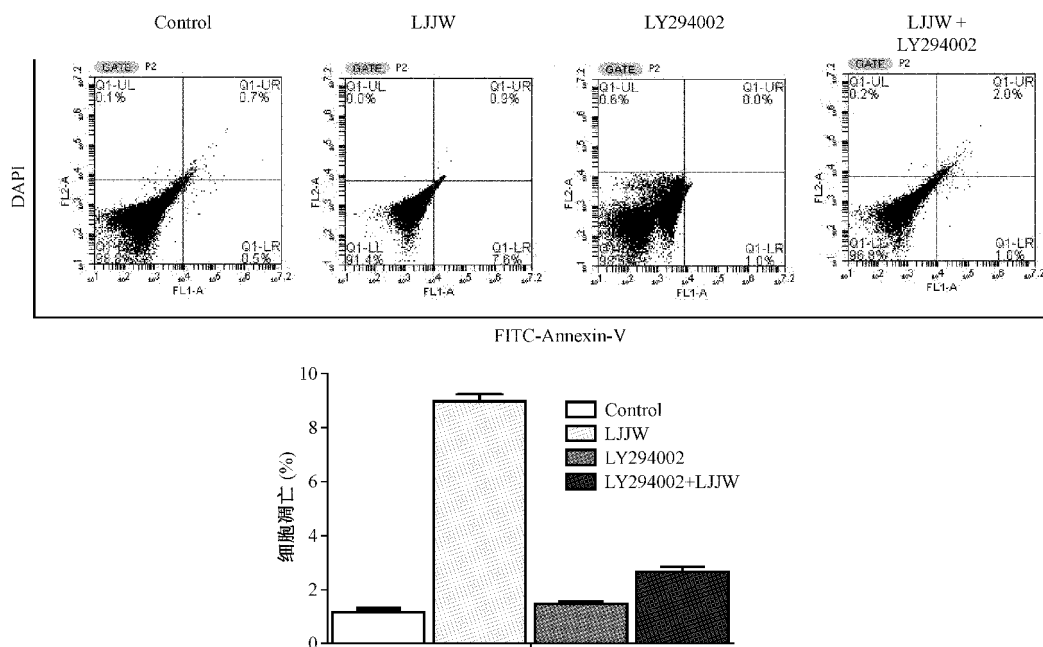


图3 鹿角胶丸促进破骨细胞凋亡

Fig. 3 Antler pill promoted apoptosis of osteoclasts

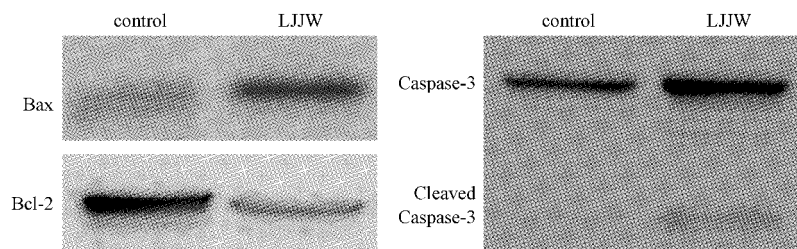


图 4 A 鹿角胶丸促进 Bcl-2 表达,抑制 Bax、Caspase3 表达

Fig. 4 A Antler pill promoted the expression of Bcl-2 and inhibited the expression of Bax and Caspase3

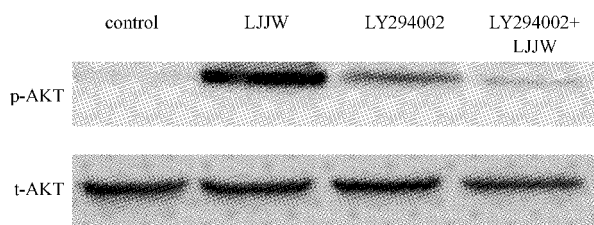


图 4 B 鹿角胶丸促进 AKT 磷酸化

Fig. 4 B Antler pill promoted the phosphorylation of AKT

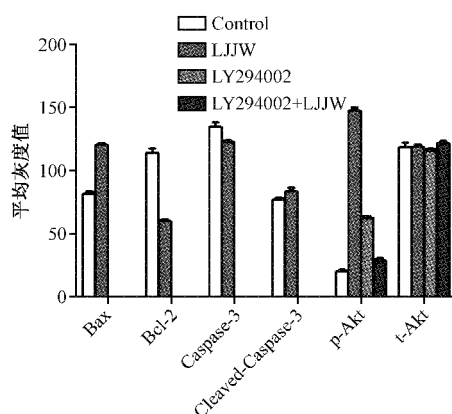


图 4 C 蛋白电泳量化图

Fig. 4 C Quantitative electrophoresis of the protein

PI3K/AKT 通路抑制 LY294002 后 AKT 的磷酸化受到抑制,预处理 LY294002 后加入鹿角胶丸,鹿角胶丸的促 AKT 磷酸化作用被抑制($P > 0.05$,与对照组相比较)。

3 讨论

研究发现 GIOP 中成骨细胞分化受抑制、凋亡增加^[4],我们前期研究发现葛根素抑制糖皮质激素诱导的成骨细胞凋亡^[5]。Shi 等^[11]发现,糖皮质激素激活 RANK-RANKL-OPG 系统,通过增加 RANKL 配体表达并减少 OPG 的表达,刺激破骨细胞分化,抑制破骨细胞的凋亡而导致骨吸收增加。因此,若应用能够促进破骨细胞凋亡的药物,对于临床防治

GIOP 具有重要的意义。

《太平圣惠方》中记载“鹿角胶丸”,由鹿角胶、附子、桂心、杜仲、山茱萸、菟丝子、熟地黄、肉苁蓉、五味子、牛膝、巴戟天组成。功效益肾补骨。方用鹿角、菟丝子等温肾壮阳,熟地、附子滋阴填精,山茱萸、牛膝等,具有温阳益阴、强筋壮骨的作用,在温补肾阳的同时能健脾益气、滋肾阴、养肝血,标本兼治。动物模型研究发现,鹿角胶丸具有促进骨形成、抑制骨吸收的药效学作用^[2,3],但具体的分子机制还不清楚。研究发现,多种中药活性成分作用于破骨细胞,促进其凋亡,如根皮素、柚皮苷等^[6,7]。因此,我们从中药鹿角胶丸调节破骨细胞为切入点,探讨其防治 GIOP 的潜在机制。

PI3-K/Akt 通路作为细胞内非常重要的信号转导途径,在细胞的生长、凋亡等过程中发挥着极其重要的生物学功能。研究发现,PI3-K/Akt 信号通路参与人破骨细胞凋亡调节^[8]。线粒体是细胞凋亡调节的关键部位,能够合成释放一系列的抗凋亡及促凋亡因子,其中 Bcl-2 家族蛋白是抗细胞凋亡的关键因子,Bax 是促进细胞凋亡的关键因子。Bcl-2 能够与 Bax 结合并抑制细胞的凋亡。研究发现 Bcl-2-Bax 复合体与破骨细胞凋亡调节密切相关^[9]。我们研究发现中药复方鹿角胶丸能够通过 PI3-K/Akt 信号通路促进破骨细胞凋亡,在调节破骨细胞凋亡的过程中中药复方鹿角胶丸通过调节 Bcl-2-Bax 复合体,促进 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 的表达,抑制 Caspase3 的裂解。

中医学认为,糖皮质激素为外源性“纯阳”之品。生理情况下,人体分泌生理剂量的糖皮质激素主要参与人体的正常工作机制,以保证阳气发挥“阳者卫外而为固也”的作用,以维持脏腑各种生理功能。若大剂量糖皮质激素使用日久,元阳之气如不敷出,过度外出而不潜降、内入、收藏,穷必及肾,终致肾之“封藏”失司,耗伤肾阴,最终导致阴阳俱虚。

目前研究骨质疏松症的发病机理虽然较多,但是基于 PI3-K/AKT 信号通路,从破骨细胞凋亡作为研究的切入点,探索中医药对破骨细胞凋亡的影响及机制的相关研究较少。因此,本研究对于中医药临床防治糖皮质激素性骨质疏松症有一定的意义。

【参 考 文 献】

- [1] Shi J, Wang L, Zhang H, et al. Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy. *Bone*, 2015, 79: 222-232.
 - [2] 王志超,李志毅. 鹿角胶丸对骨质疏松模型大鼠影响的实验研究. *中医正骨*, 2003, 15(11): 16-17.
Wang ZC, Li ZY. Experimental study on the effect of Lu jiao jiao pill on osteoporosis in rats. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2003, 15(11): 16-17.
 - [3] 侯晨艳,高继光,付尔康. 鹿角胶钙颗粒剂对大鼠实验性骨质疏松症的研究. *中国现代应用药学*, 2000, 17(1): 66-68.
Hou CY, Gao JG, Fu EK. Study on experimental osteoporosis of rats treated with calcium granule of Lu jiao jiao pill. *Chinese Modern Pharmacy*, 2000, 17(1): 66-68.
 - [4] Beavan S, Horner A, Bord S, et al. Colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in human bone. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1496-1504.
 - [5] Yu DD, Mu S, Zhao DY, et al. Puerarin attenuates glucocorticoid-induced apoptosis of hFOB1.19 cells through the JNK- and Akt-mediated mitochondrial apoptotic pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015 (36): 345-354.
 - [6] Lee EJ, Kim JL, Kim YH. Phloretin promotes osteoclast apoptosis in murine macrophages and inhibits estrogen deficiency-induced osteoporosis in mice. *Phytomedicine*, 2014, 21(10): 1208-1215.
 - [7] Li F, Sun X, Ma J, et al. Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3): 629-635.
 - [8] Yue L, Haroun S, Parent JL, et al. Prostaglandin D(2) induces apoptosis of human osteoclasts through ERK1/2 and Akt signaling pathways. *Bone*, 2014, 60: 112-121.
 - [9] Wang Y, Han R, Liang ZQ, et al. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy*, 2008, 4(2): 214-226.
(收稿日期: 2017-11-25; 修回日期: 2018-03-09)
-
- (上接第 864 页)
- [16] Kato Y, Zhao M, Morikawa A, et al. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEK2 protein family. *J Biol Chem*, 2000, 275(24): 18534-18540.
 - [17] Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, et al. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(20): 4771-4777.
 - [18] Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, et al. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J*, 1997, 16(23): 7054-7066.
 - [19] Li P, Ma YC, Sheng XY, et al. Cyclic fluid shear stress promotes osteoblastic cells proliferation through ERK5 signaling pathway. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1-2): 321-327.
 - [20] Tusa I, Cheloni G, Gray N, et al. Abstract 3904: Inhibition of the ERK5 pathway as a novel approach to target human chronic myeloid leukemia stem cells. *Cancer Research*, 2017, 77(113): 3904.
 - [21] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J*, 1990, 4(13): 3111-3123.
 - [22] Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, et al. BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 8631-8634.
 - [23] Leong ML, Maiyar AC, Kim B, et al. Expression of the serum and glucocorticoid-inducible protein kinase, sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 5871-5882.
 - [24] Oliveira FA, Matos AA, Matsuda SS, et al. Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2017, 169(1): 35.
 - [25] Hayashi M, Kim SW, Imanaka-Yoshida K, et al. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest*, 2004, 113(8): 1138-1148.
 - [26] Li P, Ma YC, Shen HL, et al. Cytoskeletal reorganization mediates fluid shear stress-induced ERK5 activation in osteoblastic cells. *Cell Biol Int*, 2012, 36(3): 229-236.
 - [27] Delaine-Smith RM, Sittichokechaiwut A, Reilly GC. Primary cilia respond to fluid shear stress and mediate flow-induced calcium deposition in osteoblasts. *FASEB J*, 2014, 28(1): 430-439.
 - [28] Basso N, Heersche JN. Characteristics of in vitro osteoblastic cell loading models. *Bone*, 2002, 30(2): 347-351.
(收稿日期: 2017-07-29; 修回日期: 2017-10-31)