

· 论 著 ·

氯化锂联合淫羊藿苷对成骨细胞增殖分化的影响

付殷¹ 孙贵才^{2*} 欧阳玉龙² 温浙旭²

1. 黑龙江中医药大学中药学博士后流动工作站, 黑龙江 哈尔滨 150000

2. 南昌大学第四附属医院骨科, 江西 南昌 330003

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 09-1221-05

摘要: **目的** 研究氯化锂(LiCl)与淫羊藿(ICA)苷联合应用对成骨细胞增殖、分化的影响,为LiCl与ICA联合应用提高成骨细胞矿化能力提供研究基础。**方法** 采用酶消化法和茜素红染色法鉴定并获得大量细胞为成骨细胞,随机分为4组即空白组、ICA组(80 nmol/L), LiCl(5 nmol/L), ICA(80 nmol/L)+LiCl(5 nmol/L)组,诱导21 d后采用茜素红法及碱性磷酸酶活性测定各组成骨细胞矿化能力及活性。采用CCK-8和Western blot法测定各组对体外成骨细胞增殖活性及成骨细胞中p-GSK3 β 、 β -catenin水平。**结果** 倒置显微镜下观察细胞多为单核、多边形及梭形,局部有细胞密集的细胞团,茜素红染色将钙化结节染成橘红色;LiCl及ICA单独作用于成骨细胞时,都可以明显促进成骨细胞的增殖,增加ALP活性及矿化能力,同时明显促进p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白的表达;但是LiCl与ICA联合应用能够明显促进成骨细胞的增殖,并且在分子水平能够明显抑制p-GSK3 β 、 β -catenin的表达,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** LiCl与ICA联合应用可以通过wnt信号通路促进成骨细胞的增殖、分化。

关键词: 氯化锂;淫羊藿苷;成骨细胞;Wnt信号通路

The effect of combined use of lithium chloride and icariin on proliferation and differentiation of osteoblasts

FU Yin¹, SUN Guicai^{2*}, OUYANG Yulong², WEN Zhexu²

1. Postdoctoral Workstation of Chinese Medicine in Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, China

2. The Fourth Hospital Attached to Nanchang University, Nanchang 330003, China

* Corresponding author: SUN Yucai, Email: 13657000633@139.com

Abstract: **Objective** To study the mechanism of the effect of combined use of lithium chloride and icariin on the proliferation and differentiation of osteoblasts, and to provide a basis for improving the mineralization ability of osteoblasts. **Methods** Enzyme digestion and Alizarin red staining were used to identify a large number of cells as osteoblasts. Osteoblasts were divided into blank group, ICA group (80 nmol/L), LiCl group (5 nmol/L), and ICA (80 nmol/L) + LiCl (5 nmol/L) group. After 21 days of induction, Alizarin red staining and alkaline phosphatase activity were used to determine the mineralization ability and activity of osteoblasts in each group. CCK-8 and Western blotting were used to determine the proliferation of osteoblasts in vitro and the contents of p-GSK3 β and β -catenin in osteoblasts. **Results** The cells were mostly mononuclear, polygonal, and fusiform under a phase-contrast microscope. There were local cell-intensive cell clusters. The calcified nodules were stained into orange-red color by Alizarin red. When LiCl or icariin alone was added in osteoblasts, the proliferation of osteoblasts was significantly promoted, the ALP activity and mineralization ability were increased, and the expressions of p-GSK3 β and β -catenin were significantly promoted. However, the combination of LiCl and ICA promoted the proliferation of osteoblasts and significantly inhibited the expressions of p-GSK3 β and β -catenin at the molecular level ($P < 0.05$). **Conclusion** The combined use of lithium chloride and icariin promotes the proliferation and differentiation of osteoblasts through the Wnt signaling pathway.

Key words: icariin; LiCl; osteoblast; Wnt signal pathway

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473503)

* 通信作者: 孙贵才, Email: 13657000633@139.com

淫羊藿苷(ICA)是中药淫羊藿的有效成分。淫羊藿为小檗科多年生草本植物,归肝、肾经,性温,味辛、甘。《本草纲目》记录了淫羊藿其有“益精气、坚

筋骨、实腰膝心力”的效果。淫羊藿苷是从淫羊藿属植物中分离得到的黄酮醇苷类化合物^[1]。对治疗骨质疏松症类疾病效果显著且不良反应小。淫羊藿及淫羊藿提取物通过对骨髓间充质干细胞诱导作用来激活成骨细胞的增殖分化及抑制破骨细胞的作用来促进骨的形成、抑制骨吸收,构建骨的平衡,进而有效地防治骨质疏松的发生发展^[2]。淫羊藿苷的分子机制已经证明其抗骨质疏松和成骨分化作用^[3-4]以及其参与雌激素生物合成。

临床应用锂于治疗造血系统疾病和双极性疾病已经有数十年^[5]。越来越多的证据表明,锂能够刺激干细胞增殖,认为其是细胞治疗机制之一^[6]。研究人员已经提出,锂可以直接刺激骨髓间充质干细胞的增殖^[7]。本研究意义在于尝试联合应用氯化锂与淫羊藿苷能否提高成骨细胞增殖及分化作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生 72 h 的 SD 乳鼠,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。动物合格证编号为 SCXK 黑 2015004。

1.2 材料

淫羊藿苷 (meilunbio, 中国), LiCl (Sigma, 美国),胎牛血清、DMEM 培养基、青霉素-链霉素混合液和胰酶 (Hyclone, 美国), CCK8 (同仁, 日本), GSK3 β 、p-GSK3 β 、 β -catenin、GAPDH 抗体购于 Abcam 公司,维生素 C、 β -甘油磷酸钠、地塞米松 (Sigma, 美国)。茜素红染液 (索莱宝, 中国), PNPP (大连美伦, 中国)。

1.3 成骨细胞分离与培养

无菌条件下取出出生 72 h 的 SD 乳鼠头骨,置入 4℃ 的 PBS 溶液中,然后应用眼科镊与手术刀剔除表面的结缔组织,用 4℃ 的 PBS 溶液反复吹打清洗组织并将其剪成小于 1 mm³ 的组织块,将剪好的组织块转移到 1.5 mL 离心管中,加 3 倍体积的胰酶,将离心管置入 37℃ 的恒温摇床中进行消化,振荡消化 20 min 后加入胎牛血清终止消化,放置于 4℃ 冰箱中静置 5 min,舍弃上清液,加入 0.2% Collagenase I,置于 37℃ 的恒温摇床中,消化并振荡 60 min 后用胎牛血清终止消化,多次吹打后通过 200 目滤网过滤去除碎片^[3],收集滤液,1 200 r/min 离心 8 min,弃上清液,用 DMEM 完全培养基进行重新悬浮细胞,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中进行培养;2 d 后换液,之后间隔 2~3 d 换 1 次培养液。并

在倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况,取培养的第三代成骨细胞进行后续实验。

1.4 ICA 对成骨细胞增殖能力影响

称取一定量的 ICA,用 DMSO 溶解,配制成为 200 μ mol/L 的 ICA 贮备液,使用前用 DMEM 基础培养液稀释所需浓度,使 DMSO 的终浓度 <0.1%。将成骨细胞密度调整为 10⁴/mL 接种于 96 孔培养板中进行培养,每孔加入 200 μ L 置于 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中进行培养,待细胞长满瓶底 80% 以上每孔中加入 ICA 终浓度为 0、10、20、40、80 nmol/L 进行继续培养 24 h 后,每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 进行继续培养 4 h 后,用酶标仪读取波长为 490 nm 处的吸光度值。

1.5 LiCl 对成骨细胞增殖影响

将成骨细胞密度调整为 10⁴/mL 接种于 96 孔培养板中进行培养,每孔加入 200 μ L 置于 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中进行培养,待细胞长满瓶底 80% 以上每孔中加入 LiCl 终浓度为 0、2、5 nmol/L 进行继续培养 24 h 后,每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 进行继续培养 4 h 后,用酶标仪读取波长为 490 nm 处的吸光度值。

1.6 LiCl 与 ICA 联合应用对成骨细胞增殖能力影响

将成骨细胞密度调整为 10⁴/mL 接种于 96 孔培养板中进行培养,每孔加入 200 μ L 置于 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中进行培养,待细胞长满瓶底 80% 以上时将相应的孔板分为 4 组即空白组、ICA 组 (80 nmol/L), LiCl (5 nmol/L), ICA (80 nmol/L) + LiCl (5 nmol/L) 组,加入相应的药物,继续进行培养 24 h,每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 进行继续培养 4 h 后,用酶标仪读取波长为 490 nm 处的吸光度。

1.7 钙化结节染色与碱性磷酸酶活性测定

用第三代成骨细胞进行成骨性诱导,在矿化诱导培养基 (100 nmol/L 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸、7 mol/L 地塞米松) 下培养。各组分别加入相应浓度药物。接种于培养板中,分为空白组 (矿化诱导培养基)、ICA 组 (80 nmol/L), LiCl 组 (5 nmol/L), ICA (80 nmol/L) + LiCl (5 nmol/L) 组,空白组给予空白诱导培养液,进行诱导 21 d 后弃掉培养液,培养板用 PBS 溶液冲洗 3 次,室温下使用 95% 乙醇固定 15 min,双蒸水冲洗 3 次,0.1% 茜素红 [茜素红-Tris-Hcl (pH 8.3)] 染色,放置培养箱中 1 h,使用双蒸水冲洗 3 次。PNPP 法测定成骨细胞 ALP 活性,成骨细胞培养 21 d 后弃培养液,应用 PBS 溶液

冲洗 2 遍,使用 1% Triton X-100 反复冻融 3 次,成骨细胞裂解物孵育在磷酸盐底物中 30 min,温度为 37 ℃,进而加入 1 mol/L 的 NaOH 终止反应,酶标仪在 405 nm 下测定其吸光度值。根据蛋白质标准化的 Sigma 校正曲线,计算各组成骨细胞酶活性^[8]。

1.8 WB 检测成骨细胞中 GSK3 β 、p-GSK3 β 、 β -catenin 蛋白含量

使用对数期的成骨细胞,并以 2×10^4 个/孔接种于 6 孔培养板,每孔均匀 2 000 μ L,待细胞贴壁后换液,按照实验分组给予相应的干预,每孔 2 000 μ L。药物干预 2 d 后,提取各组成骨细胞总蛋白,并进行蛋白定量,经 12.5% SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜上,将含有 5% 脱脂奶粉的 Tris-HCl 缓冲液室温孵育 1 h 后,加入一抗稀释液(1:100 稀释),于 4 ℃ 过夜,应用含 Tween-20 的 TBS 缓冲液洗膜 3 次,间隔 10 min/次,加入二抗工作液(1:200 稀释),在室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,间隔 10 min/次,加入 HRP 标记的二抗工作液,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,间隔 10 min/次,最后采用 ECL 法显色。采用凝胶成像系统摄片并分析,结果以目的条带与内参条带(GAPDH)光密度的比值表示^[9]。

1.9 统计学处理

以上所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析及 *t* 检验,并且结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态

将成骨细胞在倒置显微镜下观察,接种 24 h 左右细胞贴壁,继续培养 72 h 延伸出较多的突起,在培养到 7~10 d 后细胞融合为单层细胞,细胞多为单核、多边形及梭形等,如图 1 所示。

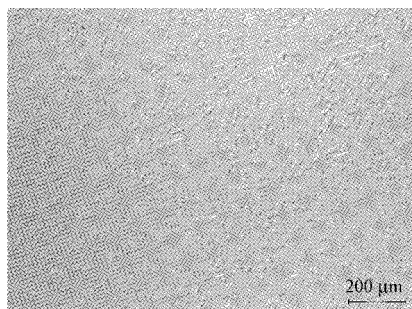


图 1 成骨细胞

Fig.1 Osteoblasts ($\times 100$)

2.1 ICA 对成骨细胞的增殖作用

如表 1 所示,CCK-8 法检测结果显示不同浓度的 ICA 都能对成骨细胞增殖产生不同程度作用,但是低浓度差异不显著。成骨细胞生长率随着淫羊藿的浓度升高而增加。

表 1 不同浓度淫羊藿对成骨细胞增殖作用影响

Table 1 Effects of different concentrations of epimedium on the proliferation of osteoblasts

浓度/(nmol/L)	OD 值
0	0.7493 $\pm$ 0.0426
5	0.8188 $\pm$ 0.014 *
10	0.8843 $\pm$ 0.0327 *
20	0.8921 $\pm$ 0.0456 *
80	0.9173 $\pm$ 0.0376 *

注:与 0 nmol/L 比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 LiCl 对成骨细胞的增殖作用

如表 2 所示,CCK-8 法检测结果显示一定浓度下氯化锂都能对成骨细胞增殖产生不同程度的促进作用,并且各不同浓度组的 OD 值比较,差异具有统计学意义。

表 2 LiCl 对成骨细胞增殖作用影响

Table 2 Effect of lithium chloride on the proliferation of osteoblasts

浓度/(nmol/L)	OD 值
0	0.6906 $\pm$ 0.0208
2	0.7571 $\pm$ 0.0123 *
5	0.8837 $\pm$ 0.0764 *

注:与 0 nmol/L 比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 LiCl 与 ICA 联合应用对成骨细胞增殖的影响

如表 3 所示,CCK-8 法检测结果显示与空白组比较,ICA 组、LiCl 组和 LiCl 与 ICA 联合组对成骨细胞的增殖均有促进作用,与淫羊藿苷组和氯化锂组比较,淫羊藿苷联合氯化锂组对成骨细胞的增殖更具有明显促进作用。

表 3 淫羊藿苷联合氯化锂对成骨细胞增殖影响

Table 3 Effect of icariin combined with lithium chloride on the proliferation of osteoblasts

组别	OD 值
空白组	0.7126 $\pm$ 0.0344
淫羊藿苷组	0.8583 $\pm$ 0.0342 **
氯化锂组	0.9277 $\pm$ 0.0231 **
淫羊藿苷+氯化锂组	0.9519 $\pm$ 0.0342 *

注:与空白组比较, # $P < 0.05$; 与淫羊藿苷+氯化锂组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 茜素红染色与 ALP 活性

茜素红染色结果如图 2 所示,结果表明淫羊藿苷、氯化锂、淫羊藿苷联合氯化锂处理的成骨细胞的

矿化能力明显增加,相对于空白组,ICA组、LiCl组和LiCl与ICA联合组的成骨细胞矿化能力明显增加,与空白组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且以LiCl与ICA联合组处理细胞钙化能力最强。图3所示ALP活性定量结果表明LiCl组、ICA组以及LiCl与ICA联合组处理的成骨细胞的活性明显增加,相对于空白组,且以LiCl与ICA联合组成骨细胞ALP活性最高,结果表明LiCl与ICA联合组对成骨细胞的矿化能力和活性影响明显强于单独使用的效果。

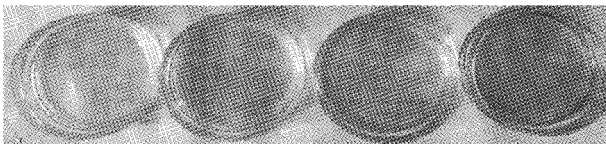


图2 成骨细胞钙化结节染色

Fig.2 Staining of calcified nodules by osteoblasts

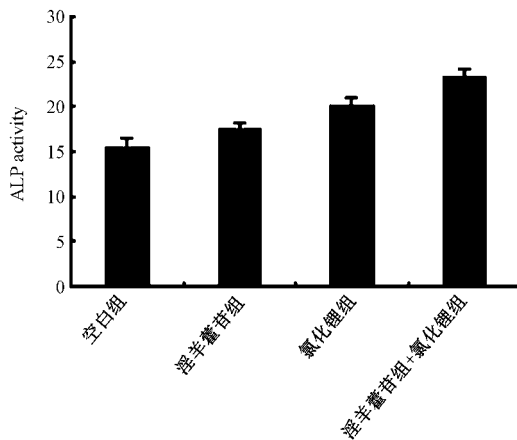
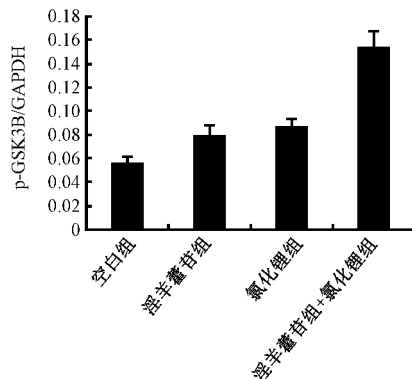


图3 ALP成骨细胞活性

Fig.3 ALP activity of osteoblasts

2.5 各组对成骨细胞中 p-GSK3 β 、 β -catenin 表达



影响

经过ICA组、LiCl组以及LiCl与ICA联合组的处理,各组成骨细胞 p-GSK3 β 及 β -catenin 蛋白表达的结果见图4~5所示,定量结果如图5所示,结果表明ICA组、LiCl组以及LiCl与ICA联合组处理的各组成骨细胞的 p-GSK3 β 及 β -catenin 蛋白表达明显增加,相对于对照组,且以LiCl与ICA联合组细胞 p-GSK3 β 及 β -catenin 蛋白表达量最多,明显优于单独使用的效果。

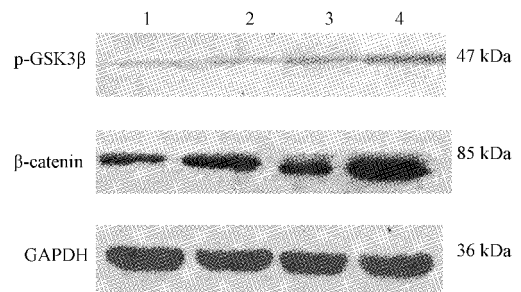


图4 各组中 p-GSK3 β 、 β -catenin 及 GAPDH 表达

注:1 对照组;2 ICA组;3 LiCl组;4 LiCl与ICA联合组

Fig.4 Expression of p-GSK3 β , β -catenin and GAPDH among groups

3 讨论

骨质疏松症是以骨的微观结构减弱为主要表现特征,骨强度下降和骨脆性增加为主要临床表现^[10],多发生于老年人群,严重危害着患者的生活质量。骨质疏松由于成骨细胞与破骨细胞生理状态异常所致^[11]。近年来的研究已经证明,淫羊藿苷可通过上调成骨细胞核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbf $\alpha 1$)、BMP-2、BMP-4 mRNA 和 Runx2 的表达而促进成骨细胞骨形成^[12]。进而提高骨密度,促进成骨细胞增殖和分化、增加松质骨骨量及抑制骨吸收的作

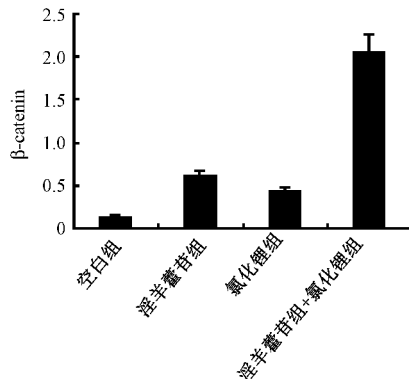


图5 成骨细胞中 p-GSK3 β 、 β -catenin 表达的定量结果

Fig.5 Expression of p-GSK3 β and β -catenin in osteoblasts

用^[13-14]。近年来,研究发现氯化锂既能促进成骨细胞增殖又能抑制破骨细胞吸收,在骨修复和骨重建中都能起到重要作用^[15],表明氯化锂是可以用来治疗绝经后骨质疏松症。最近研究发现淫羊藿苷和氯化锂均是通过促进成骨细胞增殖和抑制破骨的骨吸收来治疗骨质疏松症,尝试研究淫羊藿苷与氯化锂联合应用是否具有有叠加促进骨质疏松症的潜力。鉴于此,本实验研究淫羊藿苷与氯化锂联合治疗骨质疏松症是否有优于单独治疗骨质疏松症的潜力,为此本研究分析淫羊藿苷与氯化锂联合作用成骨细胞,观察其对成骨细胞增殖和矿化能力的影响,并且探讨其对骨质疏松症治疗的可行性。

通过 LiCl 与 ICA 联合应用发现其可增强成骨细胞的矿化能力,实验同时检测 ICA 组、LiCl 组及 LiCl 与 ICA 联合应用组间的茜素红染色,作为成骨细胞分化特异性检测标准。与单独用药组比较, LiCl 与 ICA 联合应用组更能提高促进矿化结节能力,说明 LiCl 与 ICA 联合应用更能促进成骨分化。

经典 Wnt/ β -catenin 信号通路在成骨细胞的生成及骨形成过程中起到重要的作用,而淫羊藿苷+氯化锂组通过调节 Wnt 信号通路 GSK-3 β 的磷酸化从而抑制胞质内 β -catenin 的磷酸化和降解,进而增加胞质内 β -catenin 聚集并转入细胞核。从而激活下游靶基因促进成骨细胞分化。

本研究从细胞水平与分子水平阐述了 LiCl 与 ICA 联合应用能更好地提高成骨细胞矿化能力,抑制 GSK-3 β 的磷酸化及提高 β -catenin 总蛋白的表达,进而促进成骨细胞的增殖和分化。

【参 考 文 献】

- [1] Lee MK, Choi YJ, Sung SH, et al. Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum* [J]. *Planta Medica*, 1995, 61(6):523-526.
- [2] 李建国,谢兴文,李鼎鹏,等. 中药淫羊藿治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018,24(3):389-393.
- [3] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Icariin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells [J]. *Pharmazie*, 2005, 60(12):939-942.
- [4] Meng FH, Li YB, Xiong ZL, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(3):189-193.
- [5] Young W. Review of lithium effects on brain and blood [J]. *Cell Transplantation*, 2009, 18(9):951-975.
- [6] Jim RT. Leukocytosis: side effect of lithium [J]. *Blood*, 1979, 53(5):1031.
- [7] Zhu Z, Yin J, Guan J, et al. Lithium stimulates human bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation through GSK-3 β -dependent β -catenin/Wnt pathway activation [J]. *FEBS J*, 2015, 281(23):5371-5389.
- [8] 周皖舒,陶周善. 阿司匹林联合辛伐他汀对成骨细胞增殖及分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018,24(2):170-173.
- [9] 孙贵才,徐轶尔,郑春雨,等. 滋阴补阳中药对成骨细胞 OPG 和 RANKL 表达的影响[J]. 中医药学报, 2015,43(6):15-18.
- [10] Beil FT, Seitz S, Priemel M, et al. Pathophysiology and Pathomorphology of osteoporosis [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2008, 34(6):527-534.
- [11] Zhao QX, Shao JZ, Chen W, et al. Osteoclast differentiation and gene regulation [J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2007, 12:2519-2529.
- [12] 李佳,朱爱松,谢晚晴,等. 关于补肾中药防治骨关节炎分子机制的体外实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(7):877-882.
- [13] 李伟娟,谢保平,石丽颖,等. 从 ER α /RANK 通路探讨淫羊藿苷抑制破骨细胞分化作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(7):121-126.
- [14] 戈勋,曹广尚,孙洪胜,等. 淫羊藿活性成分促进骨细胞增殖分化研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3):228-234.
- [15] Acuña-Gutiérrez IO, Escobedo-Bocardo JC, Almanza-Robles JM, et al. Development of LiCl-containing calcium aluminate cement for bone repair and remodeling applications [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 70(Pt 1):357-363.

(收稿日期: 2018-08-14;修回日期: 2018-12-21)

更正

本刊在 2019 年第 3 期第 310 页至 313 页刊登的孙平等的文章,其中涉及研究对象收集时间应无 2018 年,只有 5 月至 10 月,特此更正。

中国骨质疏松杂志编辑部 2019 年 8 月 12 日